ÜBER DIE J-BLUTGRUPPEN-AKTIVEN BESTANDTEILE DES RINDERSERUMS UND IHRE CHARAKTERISTIK

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Antonín Radaš
aus Písek, ČSSR

Göttingen 1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534926_0011

ÜBER DIE J-BLUTGRUPPEN-AKTIVEN BESTANDTEILE DES RINDERSERUMS UND IHRE CHARAKTERISTIK

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Antonín Radaš
aus Písek, ČSSR

Göttingen 1974

Diese Arbeit wurde angefertigt am Physiclogisch Chemischen Institut der Georg-August-Universität zu Göttingen

(Direktor: Prof. Dr. W. Seubert)

UNIV. LEIDEN BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. G. Birukow

Korreferent: Prof. Dr. O.W. Thiele

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.1974

Inhaltsverzeichnis

Seite

Erklärung der Abkürzungen

1. EINLEITUNG..... 1

2. METHODIK..... 7

2.1. Material.....

2.1.1. Beschaffung des Blutes..... 7

2.1.2. Gewinnung von Serum..... 9

2.1.3. Gewinnung von Erythrozyten..... 9

2.2. Lipid-Extraktion..... 10

2.2.1. Lipidreinigung..... 10

2.2.2. Gravimetrische Bestimmung der Gesamtlipide.... 11

2.3. Fraktionierung der Lipide..... 11

2.3.1. Säulenchromatographische Gewinnung von Neutrallipiden und polaren Lipiden..... 11

2.3.2. Säulenchromatographische Gewinnung von Glykolipiden..... 13

2.4. Präparation der Mukoide..... 14

2.4.1. Präparation aus Stroma..... 14

2.4.2. Präparation aus Serum..... 15

2.5. Fraktionierung durch Gelfiltration..... 16

2.5.1. Vorbereitung des Molekularsiebes..... 16

2.5.2. Packen der Säule..... 16

2.5.3. Auftragen der Probe..... 18

2.5.4. Kalibrierung der Säule..... 18

2.5.5. Elution..... 19

2.6. Fraktionierung mit Polyanionen..... 19

2.6.1. Entfernung des Dextransulfates mit Hilfe von.. Protaminsulfat..... 20

2.6.2. Bestimmung von Dextransulfat..... 21

2.6.3. Fraktionierung mit Heparin..... 23

2.7. Ultrazentrifugation..... 23

2.7.1. Bestimmung der Trockengewichte der einzelnen Serumlipoproteine..... 24

Seite

2.8. Chemische Analysen..... 26
2.8.1. Protein-Bestimmung..... 26
2.8.2. Phosphor-Bestimmung..... 27
2.8.3. Cholesterin-Bestimmung..... 27
2.8.3.1. Bestimmung von Gesamtcholesterin..... 27
2.8.3.2. Bestimmung von freiem Cholesterin..... 27
2.8.4. Glycerin-Bestimmung..... 28
2.8.5. Zucker-Bestimmung..... 29
2.8.6. Hexosamin-Bestimmung..... 29
2.8.7. Neuraminsäure-Bestimmung..... 29
2.8.8. Absorptionsspektren..... 30

2.9. Bestimmung des isoelektrischen Punktes..... 30
2.9.1. Messung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit..... 30
2.9.2. Präparative Elektrofokussierung..... 31

2.10. Perjodat-Oxydation..... 31

2.11. J-Aktivitäts-Nachweis..... 32

2.12. Elektrophorese..... 35
2.12.1. Elektrophorese in Agarose-Gel..... 35
2.12.2. Immunoelektrophorese..... 37
2.12.3. Elektrophorese in Polyacrylamid..... 39

3. ERGEBNISSE..... 40

3.1. Serumlipide..... 40

3.2. Serumfraktionierung durch Gelfiltration..... 51

3.3. Serummukoide..... 56

3.4. Fraktionierung mit Polyanionen..... 67

3.5. Fraktionierung durch Ultrazentrifugation..... 85

4. DISKUSSION..... 92

Seite

4.1. J-Aktivität..... 92

4.2. Serumproteine und -lipide..... 93

4.3. Serummukoide..... 96

4.4. Serumlipoproteine..... 99

5. ZUSAMMENFASSUNG..... 106

6. LITERATUR..... 109

Erklärung von Abkürzungen

EDTA	Aethylendiamintetraessigsäure
g	mittlere Erdbeschleunigung = 9,807 m/s^2
g.Z.	gepackte Zellen
HDL	high density lipoproteins, lösliche Lipoproteine, die in der Ultrazentrifuge oberhalb einer Dichte von 1,065 g/ml flotieren
Ig	Immunoglobulin
LDL	low density lipoproteins, lösliche Lipoproteine, die in der Ultrazentrifuge bei einer Dichte zwischen 0,96 und 1,060 g/ml flotieren
mOsm	milli-osmolar
n	Zahl der Proben
UV	Ultraviolett
U/min	Zahl der Umdrehungen/min
V_e	Elutionsvolumen
VLDL	very low density lipoproteins, lösliche Lipoproteine, die in der Ultrazentrifuge bei einer Dichte von 0,95 g/ml flotieren
x	Einzelwert
$\bar{x}$	Mittelwert
"α"-	Lipoproteine, mit Dextransulfat nicht fällbare Serumfraktion
"β"-	Lipoproteine, mit Dextransulfat fällbare Serumfraktion
γ	Dichte (g/ml)
σ	Standardabweichung = $\pm \sqrt{\frac{\Sigma(\bar{x} - x)^2}{n - 1}}$

I. EINLEITUNG

Über die molekulare Struktur der zytoplasmatischen und subzellulären Membranen gibt es eine umfangreiche Literatur. Trotzdem ist die Forschung auf diesem Gebiet noch in vollem Fluß und von besonderem Interesse; denn die Kenntnis der Membranstruktur ist von erheblicher Bedeutung für das Verständnis der Membranfunktion. Speziell die Membran der Erythrozyten ist schon vielfach Gegenstand von experimentellen Untersuchungen gewesen. Dieser Umstand ist in erster Linie darauf zurückzuführen, daß es relativ leicht ist, Erythrozytenmembranen in reiner Form zu isolieren, da in den reifen Erythrozyten der Säugetiere außer der zytoplasmatischen Membran keine anderen membranösen Strukturen vorkommen. Von besonderem Interesse ist die Erythrozytenmembran auch deshalb, weil sich auf ihrer Oberfläche verschiedenartige Antigene befinden, die als Blutgruppensubstanz bezeichnet werden und sich mit Hilfe spezifischer Antikörper nachweisen lassen. Die Gegenwart und Art dieser Antigene ist genetisch determiniert, und die Zahl der Antigenarten ist so groß, daß kaum Individuen der gleichen Art (abgesehen von eineiigen Zwillingen) existieren dürften, die einen identischen Satz von Antigenen auf ihrer Erythrozytenoberfläche besitzen.

Auf die praktische Bedeutung dieser Oberflächenantigene für verschiedene Anwendungen (Bluttransfusion, Erythroblastose, Identitätsnachweis von Individuen, Humangenetik, Haustiergenetik) braucht nur hingewiesen zu werden. Das Studium der chemischen Natur der Blutgruppensubstanzen interessiert aber auch aus allgemein biologischen Gründen. So weiß man, daß es bei der Entartung von normalen Zellen zu Tumorzellen zu einer immunologisch nachweisbaren Veränderung der Oberflächenstruktur kommt (THIELE, 1972),

die auf chemischen Änderungen von Komponenten der Membranstruktur beruhen muß. Ebenso beruhen die immunologischen Probleme bei Organtransplantationen auf der Existenz zellulärer Antigene. Es kann daher vermutet werden, daß die weite Verbreitung zellulärer Oberflächenantigene, zu deren Erforschung der Blutgruppen-Biochemie anregt, eine noch kaum zu übersehende Bedeutung in verschiedenen biologischen Vorgängen besitzt.

Viele Blutgruppensubstanzen sind nicht nur auf das Vorkommen in oder auf der Membran von Erythrozyten und anderen Zellen (zelluläre Antigene) beschränkt, sondern finden sich auch als lösliche Antigene in vielen Körperflüssigkeiten (Blutplasma, Speichel, Magensaft, Harn, Amnionflüssigkeit, Ovarialzystenflüssigkeit, Spermaplasma). Die "klassischen" ABO-Blutgruppensubstanzen des Menschen sind bisher am besten untersucht worden. Bei der Erforschung ihrer chemischen Zusammensetzung hat man sich zunächst auf die "sezernierten", d.h. durch muköse Drüsenzellen ausgeschiedenen ABO-Substanzen beschränkt (MORGAN, 1963; SZULMAN, 1966). Diese sind lösliche Makromoleküle, bei welchen man zweckmäßigerweise einen makromolekularen Träger und eine determinante Gruppe unterscheidet; nur letztere ist für die Spezifität der Blutgruppensubstanz verantwortlich. Die determinante Gruppe ist ein Oligosaccharid mit einer für die Spezifität charakteristischen Sequenz, der makromolekulare Träger ein Protein, das an das Oligosaccharid kovalent gebunden ist. Im Gegensatz zu diesen mukoiden löslichen Blutgruppensubstanzen sind die am Erythrozyten verankerten ABO-Substanzen Glycosphingolipide (YAMAKAWA und IIDA, 1953; YAMAKAWA *et al.*, 1956; KOSCIELAK *et al.*, 1960; HAKOMORI *et al.*, 1961; HANDA, 1963), deren determinante Gruppen mit denjenigen der entsprechenden Mukoide

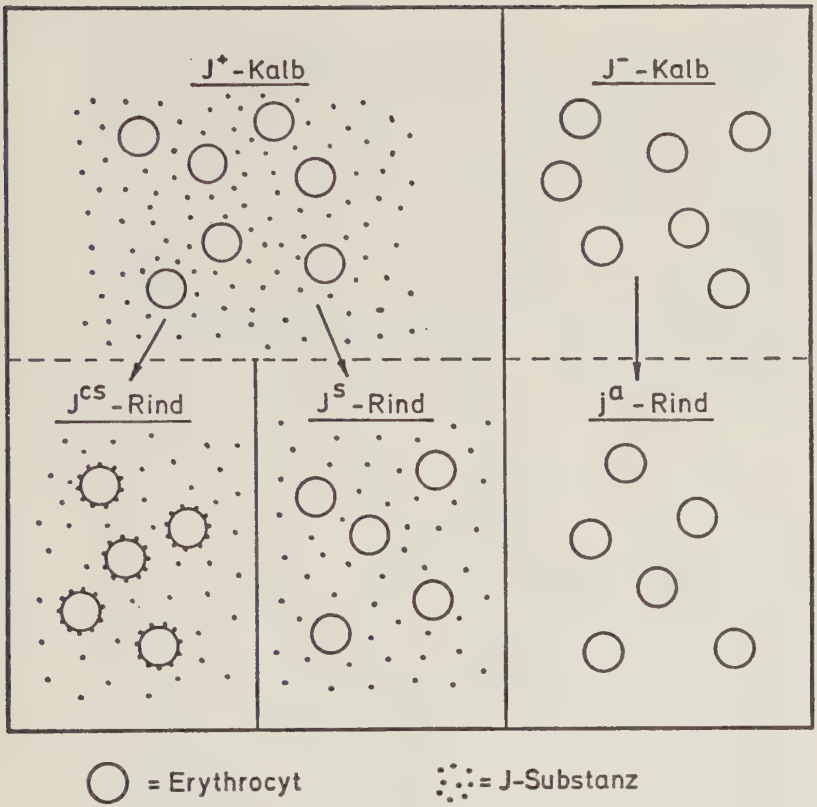


Abb. 1: Zur Klassifizierung der Rinder auf Grund der J-Blutgruppe (Nach O.W. THIELE, DGF-Tagung, München 1971).

vermutlich mindestens in den terminalen Bausteinen identisch sind. Im Falle der ABO-Substanzen gibt es demnach eine Verschiedenartigkeit der Träger bei gleicher oder ähnlicher derterminanten Gruppe (Oligosaccharid).

Im Gegensatz zu diesen klassischen, primär zellulären Blutgruppensubstanzen gibt es bei verschiedenen Säuge-

tierspezies aber auch Blutgruppensubstanzen, die primär in gelöster Form im Blutplasma vorkommen und sekundär die Erythrozytenmembran beladen (THIELE, 1972). Hierzu gehören die Antigene der Lewis-Blutgruppe des Menschen, der J-Blutgruppe des Rindes, der A-Blutgruppe des Schweines und der R-Blutgruppe des Schafes.

D.O. SCHMID hat 1962 die bis dahin bekannten Tatsachen bezüglich der J-Blutgruppe des Rindes zusammengestellt. Danach kann man hinsichtlich des Vorkommens der J-Substanz im Blutserum und auf den Erythrozyten alle erwachsenen Rinder in 3 Gruppen einteilen:

J^{cs}-Typ: Die J-Substanz findet sich sowohl als lösliches Antigen im Blutserum als auch auf den Erythrozyten,

J^{s}-Typ: Die J-Substanz findet sich nur als lösliches Antigen im Blutserum, nicht auf den Erythrozyten,

j^{a}-Typ: Die J-Substanz fehlt sowohl im Blutserum als auch auf den Erythrozyten.

Bei jungen Kälbern ist die Situation insofern anders, als sich bei ihnen die Erythrozyten immer als J-negativ erweisen. Bei den J-Merkmalsträgern findet sich also zunächst die J-Substanz nur im Blutserum, und erst bei einem Alter des Kalbes von 4-12 Wochen erfolgt die Beladung der Erythrozyten, so daß die Tiere nun dem J^{cs}-Typ angehören (Abb. 1); die Mehrzahl der Hausrinder gehört zu diesem Typ. In einem kleinen Teil der Fälle ist zwar die J-Substanz im Blutserum nachweisbar, die Beladung der Erythrozyten bleibt aber zeitlebens aus; die Tiere gehören dann dem J^{s}-Typ an. Den Tieren, die nicht J-Merkmalsträger sind, fehlt zeitlebens die J-Substanz.

URBASCHEK und THIELE wiesen 1958 am Beispiel der J-Blutgruppe des Rindes erstmals nach, daß ein im Serum gelöstes Blutgruppenantigen lipider Natur sein kann. Dieser Befund wurde in der Folgezeit durch weitere Untersuchungsergebnisse gestützt (THIELE, 1967; THIELE et al., 1962; THIELE et al., 1966; THIELE, 1968) und auch von anderen Autoren bestätigt (SLOMIANY und HOROWITZ, 1971; HOROWITZ und SLOMIANY, 1970). Später zeigte sich, daß auch einige andere im Blut gelöste Blutgruppensubstanzen Lipidnatur haben können, so die Lewis-Blutgruppen-Substanz des Menschen (MARCUS und CASS, 1969) und die A-Blutgruppen-Substanz des Schweines (THIELE und HOJNY, 1971).

Schließlich konnten THIELE und KOCH (1970) zeigen, daß die J-Substanz des Rinderserums aller Wahrscheinlichkeit nach ein Glycosphingolipid ist, dessen serologische Aktivität durch Oxydation mit Perjodat vollständig erlischt. Auch im Lipidextrakt aus Erythrozyten oder ihren isolierten Membranen konnte die J-Substanz nachgewiesen werden (SCHRÖFFEL et al., 1971). Im Serum finden sich Lipide in Form löslicher Lipoproteine. Dementsprechend wurde auch die J-Aktivität nach Ultrazentrifugation in einer, allerdings nicht weiter aufgetrennten Lipoproteinfraktion geringer Dichte gefunden (THIELE und KOCH, 1970). Weitere Untersuchungen zeigten, daß sich die J-Aktivität nicht nur in der Lipidfraktion des Serums findet, sondern auch im proteinhaltigen Rückstand nach Lipidextraktion und ebenso in einem mit Phenolwasser aus Blutserum gewonnenen Mukoid (SCHRÖFFEL et al., 1971a). Die J-Substanz kommt also im Serum in mindestens 2 verschiedenen Formen vor: Als Lipid, das in Form eines Lipoproteins vorliegt, und als Nichtlipid. Im Erythrozyten ist die J-Aktivität

jedoch nur im Lipid nachzuweisen, nicht aber im Nichtlipid (SCHRÖFFEL et al., 1971a). Aus diesen Befunden wurde geschlossen, daß nur die lipide J-Substanz zur postnatalen Beladung der Kälbererythrozyten in der Lage ist, nicht aber die nichtlipide J-Substanz.

Der Beladungsvorgang, der auch in vitro nachweisbar ist (BLAKESLEE und STONE, 1971), ist von erheblichem Interesse. Vor allem gilt es, die Frage zu beantworten, warum die Membran der Erythrozyten junger Kälber in vivo nicht beladen wird und warum die Beladung bei den J^s-Tieren ausbleibt.

Bevor eine experimentelle Bearbeitung dieses Beladungsproblems erfolgen kann, ist es sinnvoll, zunächst die chemische Natur der beiden im Serum vorliegenden Trägersubstanzen des J-Faktors genauer zu kennen. In der vorliegenden Arbeit wird der Versuch unternommen, diese Frage zu lösen.

2. METHODIK

2.1. Material

2.1.1. Beschaffung des Blutes

Tierisches Blut wurde vom Tierärztlichen Institut der Universität zu Göttingen und vom Schlachthof in Göttingen-Rosdorf geliefert. Menschliches Blut vermittelte die Blutbank Göttingen. Eine Übersicht über die zur Untersuchung gelangten Erythrozyten-Proben ist in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellt.

Tab. 1: Übersicht über die für die Gesamtlipid-Bestimmungen in Erythrozyten von Rind, Schaf, Schwein und Mensch benutzten Blutproben

Untersuchte Probe von	Blut-gruppe	Monat der Entnahme	Beschaffung von
Kuh 462	J^{cs}	Oktober	Tierärztlichem Institut
Rind 3432	J^{s}	Oktober	Tierärztlichem Institut
Kuh 233	j^{a}	Oktober	Tierärztlichem Institut
Schaf 1	R	Oktober	Tierärztlichem Institut
Schwein 87	A^{-}	November	Tierärztlichem Institut
Schwein 2	A^{+}	November	Tierärztlichem Institut
Mensch	O Rh^{+}	November	Blutbank, Göttingen
Mensch	A Rh^{+}	November	Blutbank, Göttingen

Tab. 2: Übersicht über die zur Untersuchung gelangten Rinder-Blutproben *

Untersuchtes Tier	Blutgruppe	Monat der Entnahme	Herkunft des Tieres	Zweck der Untersuchung
Kuh 1	J^{cs}	Mai	Versuchsgut Friedland	Gesamtlipid-Bestimmung im Serum zu verschiedenen Tageszeiten
Färse 1	J^{cs}	Mai		
Färse 2	j^{a}	Mai		
Färse 3	j^{a}	Mai		
Rind** 1	J^{cs}	Januar	Schlachthof Göttingen-Rosdorf	Extraktion von Mukoid mit Phenol-wasser
Rind** 1',11	j^{a}	Januar		
Rind 1,3, 12,13,14	J^{cs}	Januar		
Kalb 1	J^{cs}	Januar		
Rind 4	j^{a}	März	Schlachthof Göttingen-Rosdorf	Fraktionierung mit Sephadex G-200
Rind 5	J^{cs}	März		
Rind -	J^{s}	März		
Rind 1	J^{cs}	Januar	Schlachthof Göttingen-Rosdorf	Fällung mit Dextransulfat
Rind 6	J^{cs}	Januar		
Rind 7	J^{cs}	November		
Rind 7	J^{cs}	November	Schlachthof Göttingen-Rosdorf	Fraktionierung mit der Ultra-zentrifuge
Rind 7	J^{cs}	Dezember	Schlachthof Göttingen-Rosdorf	Elektrophoretische Trennung
Rind 8	j^{a}	Dezember	Tierärztliches Institut	

*Für Serien-Bestimmungen von Glycerin, Protein, B-Lipoprotein und Cholesterin im Serum wurden weitere 20 tierische Seren (Schlachthofblut, Tier Nr. 15-36), die im Januar gewonnen wurden, verwendet.

**Erythrozyten, bei allen anderen Tieren wurde Serum untersucht.

2.1.2. Gewinnung von Serum

Frisches Blut ließ man über Nacht bei Zimmertemperatur stehen. Das abgegossene Serum wurde zweimal zentrifugiert (4° C, 1000 x g, 10 min) und bei 4° C zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

2.1.3. Gewinnung von Erythrozyten

J^{cs}-Blut* wurde zur Gewinnung von Test-Erythrozyten im Verhältnis 4:1 mit einer Lösung von 32 g Natriumcitrat, 10 g Glucose, 5 g Sulfanilamid, 0,04 g Rivanol^{R} und 0,2 g Natriumcyanid pro Liter gemischt (SCHRÖFFEL et al., 1971). Das auf diese Weise ungerinnbar gemachte Blut wurde zentrifugiert (4° C, 1000 x g, 10 min) und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe und einer Pasteurpipette vom Blutplasma befreit. Die sedimentierten Erythrozyten wurden in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und wie oben beschrieben noch zweimal zentrifugiert. Nach dem letzten Absaugen der wäßrigen Oberschicht wurden die Erythrozyten unter vorsichtigem Rühren mit einem Glasstab zu einer 40-50%igen Suspension aufgeschwemmt. Nach der Hämatokritwert-Bestimmung mit Wintrobe-Hämatokritröhrchen (WINTROBE, 1967) wurde der zum Hämolysehemmungstest vorgesehene Teil der Erythrozytensuspension auf 1,5 % eingestellt und am selben Tage verwendet (SCHRÖFFEL et al., 1971). Die zur Gesamtlipid-Bestimmung vorgesehenen Erythrozyten wurden in derselben Weise gewonnen; nur war das Blut in isotonischer Citratlösung (1 Volumenteil einer Lösung von 20 g Natriumcitrat und 5 g Natriumchlorid in 1000 ml Wasser auf 4 Volumenteile Blut) aufgefangen worden.

---

* getestet mit internationalen Vergleichs-Antiseren; im Tierärztlichen Institut zu Göttingen wird die diesen Vergleichsseren entsprechende J-Untergruppe als J_2 bezeichnet.

2.2. Lipid-Extraktion

Die Extraktion der Gesamtlipide wurde nach DODGE et al., 1963 durchgeführt:

Je 20 ml Serum wurden in 100 ml Methanol pipettiert und 5 min stehengelassen. Dann wurden unter Rühren 100 ml Chloroform zugesetzt. Nach 10 min wurde das Gemisch in einen 1000-ml-Rundkolben filtriert (Selecta-Falten-Filter Nr. 595 1/2). Rundkolben und Filter waren vorher mit Chloroform-Methanol (1:1) gewaschen worden. Der Extraktions-Rückstand wurde dann mit dem Filter in das Extraktionsgefäß gebracht, und die Extraktion wurde noch zweimal jeweils mit einem neuen Filter wiederholt. Der gesamte Extraktions-Rückstand wurde lyophilisiert und in der Kälte (-20^{o} C) aufbewahrt. Die vereinigten Filtrate wurden bei 38^{o} C unter Vakuum im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft.

2.2.1. Lipidreinigung

Das von WELLS und DITTMER (1963) angegebene Verfahren, das den Lipidextrakt mit Hilfe von Sephadex-G-25 bis zu 99 % von Verunreinigungen befreit, wurde anstelle eines älteren Verfahrens (FOLCH et al., 1951; SPERRY, 1955) gewählt:

2 g von kleinen Teilchen befreites und trockenes Sephadex G-25 fine wurden in 10 ml Chloroform-Methanol-Wasser (120:60:9) suspendiert und in eine mit Hahn und Glaswatte versehene Glasröhre gegossen, wobei ein Verhältnis vom Durchmesser der Säule zur Säulenhöhe unter 1:15 beachtet wurde. Auf die mit weiteren 10 ml Chloroform-Methanol-Wasser gewaschene Säule wurde das in einem kleinen Volum (z.B. 5 ml) Chloroform-Methanol-Wasser (120:60:9) gelöste Lipid

gebracht. Dann wurde mit dem gleichen Lösungsmittel nachgewaschen. Das gesamte Volumen durfte 30 ml nicht überschreiten. Danach wurde die Säule mit 9 ml Chloroform-Methanol (2:1) nachgewaschen. Eluat und Waschflüssigkeit wurden in 100-ml-Rundkolben aufgefangen, zur Trockene eingeengt und in einem kleinen Volumen Chloroform-Methanol (1:1) gelöst.

2.2.2. Gravimetrische Bestimmung der Gesamtlipide

Mit Chloroform-Methanol (1:1) gewaschene Erlenmeyer-Kolben (25 ml) wurden im Vakuumtrockenschrank getrocknet (37° C, 4 h). Nach Abkühlung im Exsikkator auf Zimmertemperatur und Wägung der leeren Kolben wurde das Gesamtlipid verlustlos mit Chloroform-Methanol (1:1) in die Kolben überführt. Die Lösung wurde im Stickstoff-Strom eingedampft und im Vakuumtrockenschrank vollends getrocknet (37° C, 4 h), dann im Exsikkator abgekühlt und gewogen. Die gewogenen Lipide wurden in Chloroform-Methanol (1:1) gelöst und im Meßkolben bei -20° C aufbewahrt.

2.3. Fraktionierung der Lipide

Ein Schema der Gewinnung und Fraktionierung der Lipide aus Rinderserum ist in Abb. 2 dargestellt. Die Fraktionierung der Lipide erfolgte stets kurze Zeit nach ihrer Extraktion.

2.3.1. Säulenchromatographische Gewinnung von Neutrallipiden und polaren Lipiden

Die von BORGSTRÖM (1952) beschriebene Methode wurde verwendet: Kieselgel (Mallinckrodt, 100 mesh) wurde

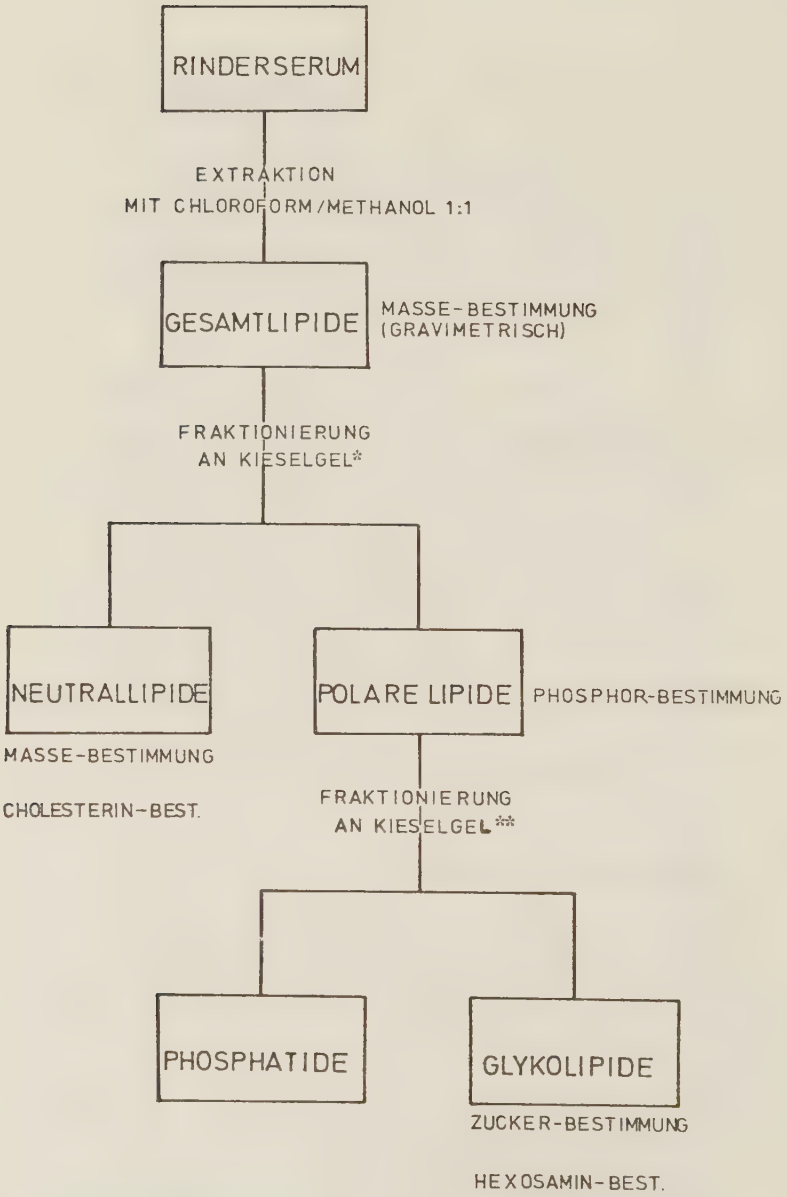


Abb. 2: Schema für die Gewinnung und Fraktionierung der Lipide aus Rinderserum

* nach BORGSTRÖM (1952)
** nach VANCE und SWEELEY (1967)

im Trockenschrank aktiviert (120° C, 24 h), dann im Exsikkator abgekühlt. Ein Teil dieses Kieselgels wurde mit dem gleichen Gewichtsteil Hyflo Super Cel (Nr. 25960 Serva, Heidelberg) gemischt und mit Chloroform zu einem Brei verrührt. Dieser Brei wurde in ein Chromatographierohr, das mit Glasfritte und Glaswatte versehen war, gegossen und bis zum Absetzen mit Chloroform gespült.
Für die Lipide aus 20 ml Serum wurden 5 g aktiviertes Kieselgel und 5 g Hyflo Super Cel eingesetzt. Der Durchmesser der Säule betrug etwa 20 mm und sein Verhältnis zur Säulenhöhe 1:7. Die Neutrallipide wurden mit 200-250 ml Chloroform, die polaren Lipide anschließend mit 200-250 ml Methanol eluiert. Die Neutrallipide wurden wie unter 2.2.2. beschrieben gravimetrisch bestimmt, im Meßkolben in Chloroform-Methanol (1:1) gelöst und bei -20° C aufbewahrt. Die Masse der polaren Lipide wurde durch Differenzbildung (Gesamtlipide - Neutrallipide) errechnet; die polaren Lipide wurden ebenfalls bei -20° C aufbewahrt, wenn sie nicht sofort verarbeitet wurden.

2.3.2. Säulenchromatographische Gewinnung von Glykolipiden

Die Fraktionierung der in 2.3.1. gewonnenen polaren Lipide wurde nach der Methode von VANCE und SWEELEY (1967) weiter fortgesetzt: 4 g aktiviertes (80° C, 13 h) Kieselgel wurde nach Abkühlung in ein mit Hahn und Glaswatte versehenes Chromatographierohr (Durchmesser = 1 cm) in Form einer Chloroform-Suspension gegossen. Die Säule wurde mit weiteren 15 ml Chloroform gewaschen. Die eingeengte Lösung von polaren Lipiden wurde auf die Säule gebracht

und mit 200 ml Aceton-Methanol (9:1) eluiert. Die so gewonnene Glykolipidfraktion wurde im Rotationsverdampfer eingeengt, danach in Chloroform-Methanol (1:1) gelöst und in einen Meßkolben (25 ml) eingefüllt.

2.4. Präparation der Mukoide

Aus Erythrozytenstroma und gefriergetrocknetem Serum wurden Mukoide (Mukoproteine) mit Phenolwasser extrahiert (KLENK und UHLENBRUCK, 1958). Der Extrakt wurde durch Dialyse von Phenol befreit und durch Fällung mit Alkohol fraktioniert.

2.4.1. Präparation aus Stroma

Zur Stromadarstellung wurde die Methode von BURGER et al. (1968) angewendet: Es wurde von einer Suspension von Rindererythrozyten (Hämatokrit 40-60 %) ausgegangen, die nach SCHRÖFFEL et al. (1971) hergestellt wurde (unter 2.1.3. bereits ausgeführt). Je 25 ml dieser Suspension wurden in eine Serie von Plastik-Zentrifugenröhrchen pipettiert, die je 225 ml Veronal-Natrium-Puffer enthielten (15 mOsm Veronal-Na-Puffer, pH = 7,4 mit 3 mM $MgCl_2$, 4° C). Das Gesamtvolumen (250 ml) wurde auf den Zentrifugenröhrchen markiert. Dann wurde zentrifugiert (4° C, 20 000 x g, 40 min) und der hämoglobinhaltige Überstand dekantiert. Der Rückstand wurde unter Schwenken mit frischem Puffer bis zur 250-ml-Marke aufgefüllt und 3 x auf dieselbe Weise zentrifugiert. Dann folgte die Phenolwasser-Extraktion des Rückstandes (des Stromas) nach KLENK et al. (1958): Hierzu wurde das Stroma zu-

nächst in kleinere Plastik-Zentrifugenröhrchen mit Wasser überführt und durch erneutes Zentrifugieren von dem überschüssigen Wasser befreit. Das auf 2° C abgekühlte Stroma wurde mit kaltem (5° C) 75%igen Phenolwasser (3 g Phenol mit 1 ml Wasser) versetzt (je 0,32 ml auf 1 ml gepackten Erythrozyten entsprechendes Stroma) und zentrifugiert (4° C, 2500 x g, 30 min). Die farblose, opalisierende wäßrige Phase wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgehoben und in einer Saugflasche gesammelt. Der Rückstand wurde mit kaltem Wasser (5° C, 0,06 ml) versetzt. Nach 15 minütigem Schütteln wurde in gleicher Weise zentrifugiert und die wäßrige Phase abgehebert. Der Phenolwasser-Extrakt (Roh-Mukoid) wurde 3 Tage gegen fließendes Leitungswasser, dann gegen mehrmals gewechseltes destilliertes Wasser im Kühlraum (4° C) dialysiert, dann lyophilisiert und auf der analytischen Waage gewogen. Das Roh-Mukoid wurde nach dem Verfahren von UHLENBRUCK und SCHMID (1962) gereinigt: Eine 1 %ige Lösung von Roh-Mukoid wurde hergestellt. Ein geringer unlöslicher Teil wurde abzentrifugiert und verworfen. Das gelöste Roh-Mukoid wurde mit 1 %iger Kaliumacetat-Lösung in 96 %igem Äthanol stufenweise fraktioniert (die Endkonzentrationen an Äthanol betrugen 50, 55.....85 %). Die Hauptmenge des Mukoids fiel bei 55 % Endkonzentration aus. Sie wurde abgetrennt und mit 55 %igem Äthanol (mit Kaliumacetat-Gehalt) gewaschen, lyophilisiert und gewogen.

2.4.2. Präparation aus Serum

Serum wurde in Kunststoff-Zentrifugenrohre pipettiert und gefriergetrocknet. Je 1 g gefriergetrocknetes Serum wurde mit 2,5 ml Wasser und mit

4 ml 75 %iger Phenolwasserlösung versetzt und zentrifugiert (4° C, 2500 xg, 30 min). Dann wurde wie unter 2.4.1. weiter gearbeitet.

2.5. Fraktionierung durch Gelfiltration

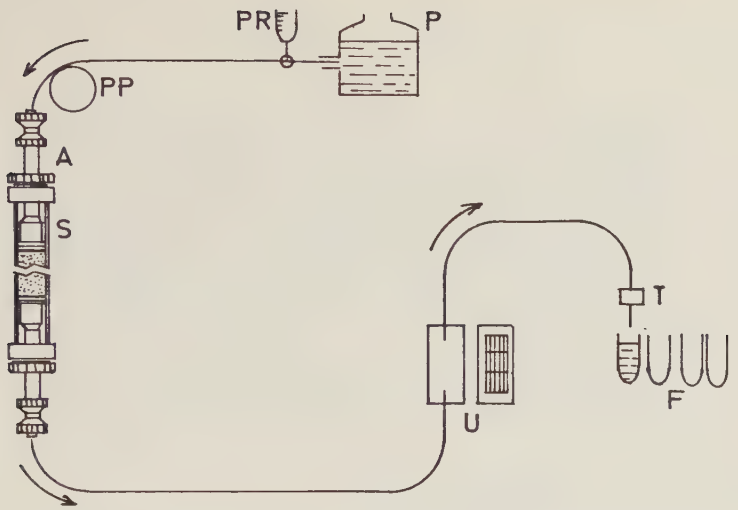
Die von mir übernommene Methode wurde von PORATH et al. (1963) eingeführt. Danach wird mit Hilfe von Dextran-Gel, das als Molekularsieb wirkt, die Trennung von Substanzen (darunter auch Proteinen) nach ihrer Molekülgröße ermöglicht. Als Dextran-Gel wurde Sephadex G-200 verwendet, wie für Humanserum von MÜLLER (1968) und FIREMANN et al. (1964) beschrieben.

2.5.1. Vorbereitung des Molekularsiebes

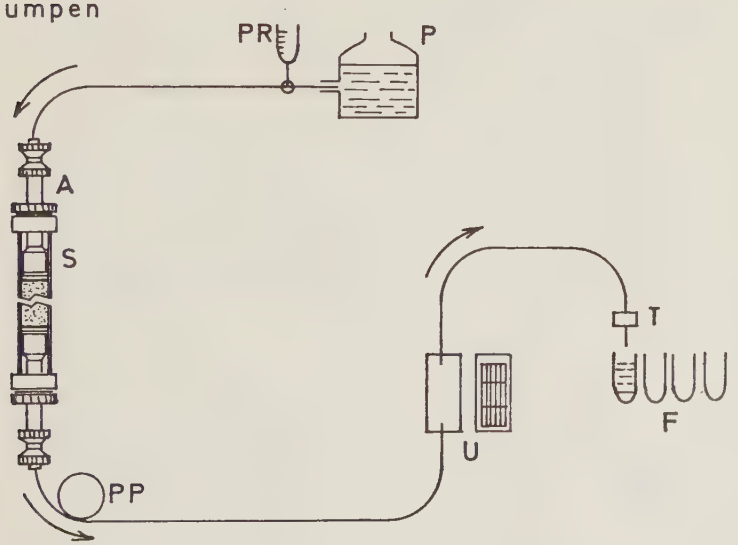
Sephadex G-200 fine (Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit Perldurchmesser zwischen 40 und 120 µm (Quellvolumen 30-40 ml/g) wurde 4 Tage lang in physiologischer Kochsalzlösung bei 4° C gequollen. Der Quellvorgang konnte durch Kochen im siedenden Wasserbad (5 h) beschleunigt werden. Bei der Auswertung zeigte sich, daß kein Unterschied in den Trenneigenschaften der mit den beiden Quellmethoden hergestellten Sephadexpräparaten besteht. Das gequollene Sephadex wurde gründlich evakuiert, um Luftblasen zu entfernen.

2.5.2. Packen der Säule

Gequollenes, auf 4° C abgekühltes und evakuiertes Sephadex G-200 (10 g in 400 ml physiologischer Kochsalzlösung) wurde in eine senkrecht eingespannte Röhre (Standardröhre der Fa. Pharmacia, Uppsala,



I. Pumpen



II. Saugen

R = Reservoir mit physiolog.NaCl-Lösung, PR = Behälter für Probe
PP= Peristaltische Pumpe, A = Adapter, S = Sephadex - Säule, U = Ultraviolett-Photometer mit Schreiber, T = Tropfenzähler, F = Fraktionssammler

Abb. 3: Schema der Apparatur zur Gelfiltration mit Sephadex G-200

Schweden, 100 x 0,9 cm) gegossen. Durch Verdünnung des Geles mit physiologischer Kochsalzlösung und Beklopfen der Röhrenwandung wurden restliche Luftblasen entfernt. Die Säule wurde mit einem Durchflußadapter oben verschloßen und mit physiologischer Kochsalzlösung 2 h lang bei 4° C gewaschen; dabei wurde eine peristaltische Pumpe (LKB Typ 4992 A-2) verwendet. Die gleichmäßige Verteilung des Geles wurde durch abwechselndes Saugen und Pumpen erzielt (Abb. 3).

2.5.3. Auftragen der Probe

Die zu untersuchende Probe (z.B. Serum) wurde in den Probebehälter pipettiert (Abb. 3: PR). Bei laufender Pumpe wurde die Probe durch den geöffneten Dreiwegehahn auf die Säule gebracht. Das Volumen der Serumprobe hat in keinem Falle 2 ml überschritten. Für die gleichmäßige Verteilung der Proben auf die Oberfläche des gepackten Geles sorgte ein Durchflußadapter (Abb. 3: A). Alle Operationen wurden im Kühlraum (4° C) durchgeführt.

2.5.4. Kalibrierung der Säule

Das äußere Volumen (Ausschlußvolumen) V_o der Säulenfüllung wurde durch Filtration von 2 ml konzentrierter Lösung von Dextranblau (Nr. 18706 Serva) bestimmt. Zur Molekulargewichts-Bestimmung wurden Molekulargewichts-Standards (Nr. 39064, Serva) benutzt. Die Elutionsvolumina V_e der einzelnen Standard-Substanzen (Maxima der Elutionskurven) wurden wie bei MURPHEY et al. (1967) gegen die Molekulargewichte halblogarithmisch aufgetragen (Abb. 8).

2.5.5. Elution

Als Elutionsmittel wurde 0,9 %ige NaCl-Lösung (physiologische Kochsalzlösung) benutzt. Zur Registrierung der Elutionskurven diente ein Ultraviolett-Absorptiometer Uvicord II. Typ 8301 A mit Detektor (Typ 8303 A) und Fraktionssammler Ultralac 7000 (Abb. 2: U,F). Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 0,66 ml/min, das Volumen der einzelnen Fraktionen blieb mit 6,5 ml konstant. Die Extinktion jeder Fraktion wurde mit einem Beckman-Spektralphotometer nachgemessen (bei 280 und 254 nm). Die so entstandene Elutionskurve wurde mit der automatisch bei 280 nm gezeichneten Kurve verglichen. Die Elution wurde bei konstanter Temperatur (4° C) im Kühlraum durchgeführt.

2.6. Fraktionierung mit Polyanionen

Die Fällung von Lipoproteinen mit Hilfe verschiedener Polyanionen wurden von BURSTEIN et al. (1970) und BURSTEIN und SAMAILLE (1957) und CORNWELL und KRUGER (1961) beschrieben. Mit Dextransulfat gefällte Lipoproteine wurden aufgrund ihres Cholesterin-Gehaltes mit den durch Ultrazentrifugation erhaltenen Lipoproteinen von KRITCHEVSKY et al. (1963) untersucht. Einen genaueren Vergleich zwischen beiden Fraktionierungsmethoden haben WALTON und SCOTT (1964) angestellt.
In der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren von KRITCHEVSKY et al. (1963) angewendet: In ein Zentrifugenglas wurden 50 ml frisches Serum pipettiert. Zu jedem ml des Serums wurde 0,04 ml einer 5 %igen Dextransulfat-Lösung und 0,1 ml einer Calciumchlorid-Lösung (11,1 % = 1 M) zugesetzt; die Mischung ließ

man 24 h bei 4° C stehen. Dann wurde das Gemisch zentrifugiert (1000 x g, 10 min) und der Überstand, der die α-Lipoproteine enthielt, abgegossen. Das Präzipitat wurde in 0,9 %iger NaCl-Lösung (0,1 ml/ml Serum) gelöst und eine 12,7 %ige Lösung von Kaliumoxalat (0,1 ml/ml Serum) zugefügt. Nach Stehenlassen (4° C, 24 h) wurde das inzwischen präzipitierte Calciumoxalat abzentrifugiert und der Überstand, der β-Lipoproteine enthielt, dekantiert.

2.6.1. Entfernung des Dextransulfates mit Hilfe von Protaminsulfat

Um eine mögliche Beeinflussung der elektrophoretischen Beweglichkeit (BURSTEIN et al., 1957) und der J-Aktivität durch die Anwesenheit von Dextransulfat zu vermeiden, wurde in weiteren Versuchen nach Fraktionierung mit Dextransulfat dieses durch Fällung mit Protaminsulfat nach CORNWELL und KRUGER (1961) beseitigt: Zu 100 ml Serum, das in ein Kunststoff-Zentrifugenrohr pipettiert wurde, wurden 2 ml 10 %ige Dextransulfat-Lösung und 10 ml einer Calciumchlorid-Lösung (11,1 %) zugefügt und das Gemisch zentrifugiert (Mooel Zeta 20, Rotor Nr. 8720, 5450 x g, 20 min).

Nach Dekantieren des Überstandes wurde der Rückstand (β-Lipoprotein-Dextransulfat-Komplex) in 10 ml 5 % NaCl-Lösung gelöst, mit 90 ml Wasser verdünnt und mit 10 ml Calciumchlorid-Lösung (11,1 %) erneut gefällt. Dann wurde wie oben zentrifugiert.

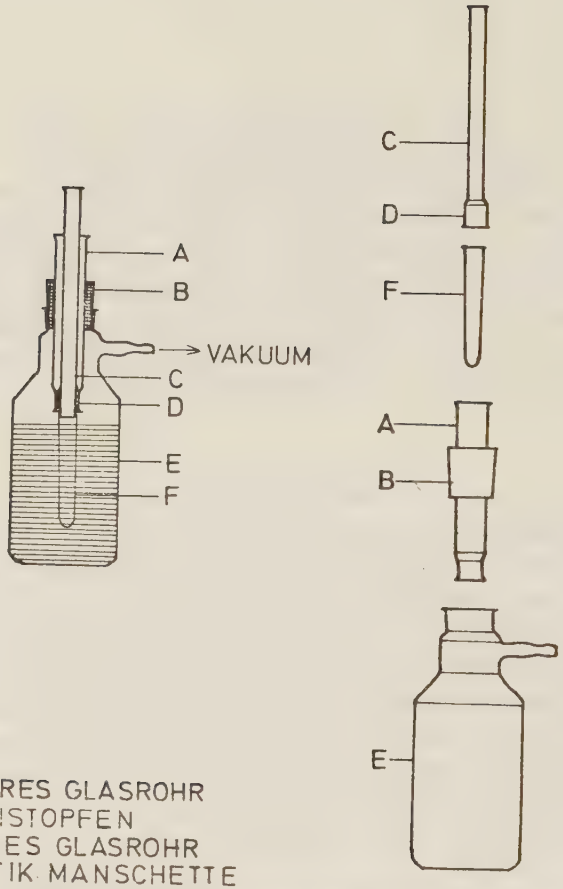
Das Präzipitat (β-Lipoprotein-Dextransulfat-Komplex) wurde in 5 ml Natriumoxalat-Lösung (1,34 % = 0,1 M) gelöst, 2 g NaCl und 2,5 ml Protaminsulfat-Lösung (2 %, Sigma, St. Louis, USA) zugefügt, zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Der letzte

Schritt wurde noch einmal wiederholt. Der sedimentierte Dextransulfat-Protaminsulfat-Komplex wurde verworfen und der Überstand mit dem vorher gewonnenen Überstand ("β"-Lipoprotein-Lösung) vereinigt. Anschließend wurde diese "β"-Lipoprotein-Lösung gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert (4° C) und mit Hilfe einer Kollodiumhülse (Nr. 13200 Sartorius, Göttingen) mit NaCl-Lösung (etwa 0,2 %) als Außenflüssigkeit eingeengt (Abb. 4).

2.6.2. Bestimmung von Dextransulfat

Die erfolgte Entfernung von Dextransulfat mittels des oben beschriebenen Verfahrens wurde durch Dextransulfat-Bestimmung kontrolliert. Hierfür diente die von WALTON und RICKETTS (1954) beschriebene Methode der Metachromasie von Toluidinblau durch Komplexbildung dieses Farbstoffes mit dem Polysaccarid. Daß eine direkte Proportionalität zwischen der Konzentration des Polysaccharides und der Farbintensität des Komplexes besteht, wurde von MacINTOSH (1941) am Heparin gezeigt.

Im einzelnen wurde folgendermaßen (etwas modifiziert) vorgegangen: Als Vergleich diente eine wäßrige Lösung von 20 mg Dextransulfat/l (2 µg/100 µl), als Farbstoff eine Lösung von 1,5 mg Toluidinblau (Serva Nr. 36692) in 100 ml einer wäßrigen Lösung, die 0,2 mg NaCl und 10 ml 0,1 N HCl enthielt; der pH-Wert der Farblösung wurde durch tropfenweisen Zusatz von 0,1 N HCl auf 2,04 eingestellt. Zur Dextransulfat-Bestimmung wurden 100 µl der zu untersuchenden Lösung (bzw. Wasser oder Serum



A- ÄUSSERES GLASROHR
B- GUMMISTOPFEN
C- INNERES GLASROHR
D- PLASTIK MANSCHETTE
E- SAUGFLASCHE ZUR AUFNAHME DER AUSSENFLÜSSIGKEIT
F- KOLLODIUMHÜLSE ZUR AUFNAHME DER EINZUENGENDEN LÖSUNG

Abb. 4: Konzentrierung von Proteinlösungen mit Kollodiumhülsen (Sartorius, Göttingen).
Schema für die Zusammensetzung von Hülse, Haltevorrichtung und Standgefäß

zur Blindwert-Bestimmung) zu je 3 ml Toluidinblau-Lösung zugefügt. Von diesem Gemisch wurde ein Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von 720-490 nm gemessen (Beckman - Spektralphotometer).

2.6.3. Fraktionierung mit Heparin

Entsprechend der Fraktionierung von Serumlipoproteinen mit Dextransulfat wurde eine solche mit Heparin beschrieben (BURNSTEIN und SAMAILLE, 1958). Sie wurde mit einer fertigen Testkombination (Nr. 15954 Boehringer, Mannheim) an menschlichem und Rinder-Serum durchgeführt. Hiervon wurde je 0,05-0,1 ml verwendet. In den damit ausgefällten "B"-Lipoproteinen wurde eine Cholesterin-Bestimmung mit dem ebenfalls in der Test-Kombination enthaltenen Reagens (Dimethylbenzolsulfonsäure und Acetanhydrid) durchgeführt und das Ergebnis als "B"-Lipoprotein-Cholesterin in mg/100 ml Serum ausgedrückt (WATSON, (1960).

2.7. Ultrazentrifugation

Durch Ultrazentrifugation bei bestimmter Dichte lassen sich die löslichen Serum- oder Plasmalipoproteine in verschiedene Klassen fraktionieren. Während für menschliche Plasmalipoproteine umfangreiche Untersuchungen vorliegen, wurden für tierische Plasmalipoproteine bisher nur wenige Arbeiten veröffentlicht. So wurden beim Rind Plasmalipoproteine mit höherer Dichte (H D L) von JONAS (1972, 1972a) untersucht. Die gesamten Lipoproteine im Plasma des Schweines wurden von FIDGE (1973) isoliert und charakterisiert. Von mir wurde die Methode von JANADO *et al.* (1966), die für Schweine-Serum beschrieben worden war,

übernommen. Diese Methode wurde mit Erfolg im hiesigen Institut bei der Fraktionierung der löslich gemachten Lipoproteine der Erythrozytenmembran des Rindes von KIRCHHOF (1972) erprobt. Man ging von 500 ml Serum (Rind J^{cs} Nr. 7) aus. Seine Dichte (γ), die mit dem Aräometer bei Zimmertemperatur bestimmt wurde, betrug 1,031 g/ml. Die Genauigkeit des Aräometers wurde durch Messung mit einem Pyknometer kontrolliert. Auch hierbei ergab sich eine Dichte von 1,031 g/ml*). Bei Zimmertemperatur wurden zu je 100 ml frischen Serums 100 mg EDTA zugesetzt. Dann wurden, wie Abb. 5 zeigt, Dichten von 1,060; 1,007; 1,170 g/ml (bei 4^{o} C) eingestellt und Zentrifugationen (Winkelrotor Ti 60, 4^{o} C) durchgeführt. Eine Übersicht über den Arbeitsgang zeigt Abb. 5. Die ölige Oberphase wurde jeweils mit einer auf 4^{o} C abgekühlten Injektionsspritze abgesaugt und ihr Volumen bestimmt. Die einzelnen Lipoprotein-Fraktionen wurden gegen physiologische Kochsalzlösung (4^{o} C) dialysiert und kurze Zeit bei 4^{o} C aufbewahrt.

2.7.1. Bestimmung der Trockengewichte der einzelnen Serumlipoproteine

Lipoprotein-Lösung aus je 10 ml Ausgangsserum wurde 24 h gegen verdünnte NaCl-Lösung (etwa 0,2 %), dann unter ständigem Rühren und häufigem Wechsel der Außenflüssigkeit gegen destilliertes Wasser weitere 48 h bei 4^{o} C dialysiert. Die so von anorganischen Salzen (NaCl, NaBr) weitgehend befreite Lösung wurde lyophilisiert, danach 4 h im Vakuumtrockenschrank (38^{o} C) getrocknet und gewogen.

---

*) Masse des Serums = 51,5525 g; Volumen = 50 ml

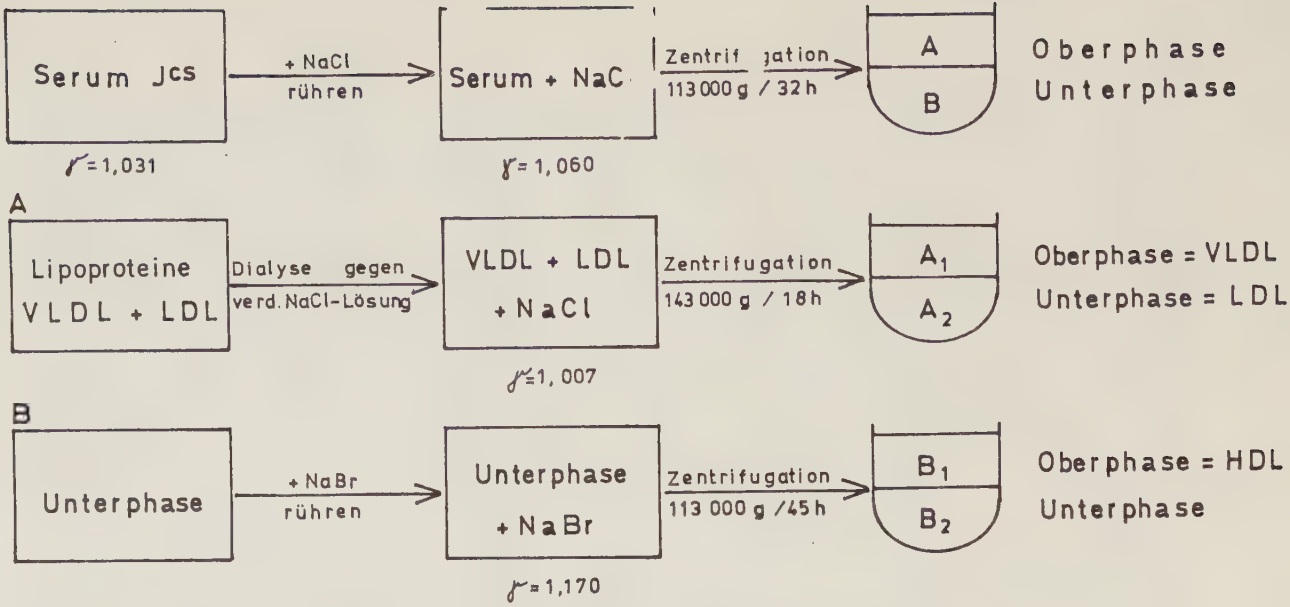


Abb. 5: Schematische Darstellung der Ultrazentrifugation von J^{CS}-Rinderserum. γ = Dichte (g/ml); VLDL = very low density lipoproteins; LDL = low density lipoproteins; HDL = high density lipoproteins

2.8. Chemische Analysen

2.8.1. Protein-Bestimmung

Zur Protein-Bestimmung wurden wäßrige Probelösungen verwendet, die 5-100 µg Protein/0,2 ml enthielten. Die Bestimmung wurde nach LOWRY et al. (1951) durchgeführt. Als Standardsubstanz diente Rinderserumalbumin (RHD 20, Behringwerke), dessen Konzentration durch Messung der Extinktion bei 280 nm eingestellt wurde, wobei ein Wert von $E^{1\,\%}_{1\,cm} = 6{,}60$ zugrunde gelegt wurde (COHN et al., 1947). Die Rinderseren wurden gleich nach der Gewinnung, die einzelnen Serumfraktionen so rasch wie möglich nach der Fraktionierung auf Protein untersucht. Zur Protein-Bestimmung im Serummukoid wurde gereinigtes Mukoid in wäßriger Lösung (0,05-1 mg Mukoid/ml) verwendet.

Die Protein-Bestimmung nach LOWRY et al. (1951) beruht auf der Gegenwart von Tyrosin im analysierten Protein. Der Tyrosingehalt des als Standardsubstanz verwendeten Rinderalbumins beträgt nach STEIN und MOORE (1949) 5,06 %. Die Ergebnisse der Bestimmung nach LOWRY et al. (1951) können nur als gesichert gelten, wenn in allen analysierten Proben der Tyrosingehalt/100 Massenteilen Protein derselbe ist wie in der Standard-Substanz. Diese Voraussetzung ist in den von mir untersuchten Proben als angenähert erfüllt anzusehen, vielleicht mit Ausnahme der Serummukoide. Daher wurde eine Serummukoid-Probe vergleichsweise auch mit der auf der Gegenwart der Peptidbindungen beruhenden Biuretreaktion (GORNALL et al., 1949) unter Verwendung derselben Standard-Substanz analysiert. Die Ergeb-

nisse beider Bestimmungsmethoden erwiesen sich als praktisch identisch. Die Methode von LOWRY et al. (1951) wurde daher und wegen ihrer erheblich größeren Empfindlichkeit durchweg bevorzugt.

2.8.2. Phosphor-Bestimmung

Die Phosphor-Bestimmung in Lipiden wurde nach der von KING (1932) beschriebenen Methode durchgeführt. Hierfür wurden etwa 0,02-0,04 mg von polaren Lipiden oder die etwa doppelte Menge von Gesamtlipiden je Probe eingesetzt. Als Standard-Substanz wurde KH_2PO_4 (Art. 4783 Merck) in wäßriger Lösung (entsprechend etwa 3 mg Phosphor/l) verwendet.

2.8.3. Cholesterin-Bestimmung

Nach der von COURCHAINE et al. (1959) ausgearbeiteten Methode wurde Gesamt- und freies Cholesterin bestimmt. Die Bestimmung wurde im Serum direkt, in aus Serum isolierten Neutrallipiden oder in aus bestimmten Serumfraktionen isolierten Gesamtlipiden durchgeführt.

2.8.3.1. Bestimmung von Gesamt-Cholesterin
Serum (0,4 ml) wurde in einen 10-ml-Meßkolben pipettiert. Aceton-Äthanol (1:1) wurde unter Schwenken zugesetzt und zur Marke aufgefüllt. Dann wurde durch einen Papierfilter (Whatman Nr. 2) rasch filtriert. 2,5 ml des Filtrates wurden in ein Reagenzglas überführt und unter Stickstoff eingedampft. Bei der Bestimmung an isolierten Lipiden wurde etwa 0,1 mg Neutrallipid oder etwa 0,2 mg Gesamtlipid verwendet. Die Proben wurden in je 6 ml Eisessig gelöst. Dann wurden 4 ml $FeCl_3$ ent-

haltendes Farbreagenz nach Vorschrift zugesetzt, jedes Röhrchen mit Parafilm bedeckt, durch mehrmaliges Umkippen gemischt und bei 550 nm photometriert.

2.8.3.2. Bestimmung von freiem Cholesterin
2,5 ml des Filtrates, das wie bei der Gesamtcholesterin-Bestimmung gewonnen worden war, wurden auf etwa 1 ml eingedampft. Nach der Zugabe von 1 ml Digitonin-Lösung wurde gemischt und 10 min bei Zimmertemperatur stehengelassen. Danach wurde bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde in 4 ml Aceton gelöst und gründlich gemischt. Die Zentrifugation wurde in derselben Weise wiederholt. Das als Cholesterin-Digitonid ausgefallene freie Cholesterin wurde weiter wie bei der Gesamtcholesterin-Bestimmung photometrisch untersucht. Das für die Standardkurve benutzte Cholesterin (Art. 2471 p.a., Merck, aus Chloroform umkristallisiert) wurde in Eisessig gelöst (50-150 mg Cholesterin/ 100 ml).

2.8.4. Glycerin-Bestimmung

Mit der Test-Kombination "Boehringer" (Nr. 15985 TNAA) wurde nach der von SCHMIDT und DAHL (1968) beschriebenen Methode die enzymatische Glycerin-Bestimmung durchgeführt. 1-2 mg Gesamtlipide wurden für die Untersuchung der aus der durch Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen eingesetzt. Bei 20 weiteren Rindern wurde Glycerin auch direkt im Serum bestimmt.
Eine ausführliche Beschreibung der Methode findet sich bei PLOTKIN (1973).

2.8.5. Zucker-Bestimmung

Die von RADIN et al. (1955) angegebene Methode wurde benutzt. Die Serumlipid-Proben wurden vor der Analyse nach VANCE und SWEELEY (1967) fraktioniert. Für jede Bestimmung wurden 3-5 mg polaren Lipiden entsprechende Fraktionen eingesetzt. Für die Bestimmung von Zucker in Mukoiden wurde 0,2-1 mg Mukoid eingewogen. Als Standard wurde in allen Fällen D(+)-Galaktose (20 mg in 100 ml H_2O) benutzt.

2.8.6. Hexosamin-Bestimmung

Die für die Zucker-Bestimmung verwendeten Fraktionen wurden auch zur Hexosamin-Bestimmung benutzt. Hierzu diente die 1948 von BLIX ausgearbeitete Methode. Für die einzelnen Proben wurden 0,4-0,7 mg Mukoide in wäßriger Lösung verwendet. Als Standard diente Glucosaminhydrochlorid (Nr. 55142, Merck), in Wasser gelöst (etwa 3-4 mg/100 ml).

2.8.7. Neuraminsäure-Bestimmung

Die Bestimmung wurde nur im Serummukoid nach der Vorschrift von WARREN (1959) durchgeführt. Proben von 10-110 µg Mukoid wurden eingesetzt. Durch Hydrolyse freigesetzte N-Acylneuraminsäure wurde mit Perjodat oxydiert und die Spaltprodukte mit Thiobarbitursäure zu einem Farbstoff kondensiert, der mit Cyklohexanon extrahiert und bei 549 nm photometriert wurde.

2.8.8. Absorptionsspektren

Von in physiologischer Kochsalzlösung gelösten Proben (Mukoide, Serum, Serumfraktionen nach Fällung mit Dextransulfat) wurden in Quarzküvetten Absorptionsspektren im Bereich von 650 bis 240 nm mit dem Beckman-Spektralphotometer gemessen und die Werte mit einem Schreiber (Beckman 10" Recorder) registriert. Die untersuchten Lösungen enthielten zwischen 40-60 mg Protein/100 ml (0,04-0,06 %). Der Proteingehalt war nach LOWRY et al. (1951) bestimmt worden.

2.9. Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Der isoelektrische Punkt von Serummukoid wurde mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt:

2.9.1. Messung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit

Acetatpufferlösungen (0,04 M) mit 4 verschiedenen pH-Werten (4,4; 4,8; 5,2; 5,6) wurden vorbereitet. In einer Elektrophorese-Kammer (Elphor, Bender und Hobein) wurde je eine Acetatfolie mit den jeweiligen Pufferlösungen getränkt. Auf die Mitte der so vorbereiteten Folien wurden 50 µl Mukoidlösung aufgetragen (25 mg Mukoid/2 ml Wasser. Dann wurde 1 h bei 100 V getrennt. Nach Färbung mit Amidoschwarz (Merck 10 B, Art. 1167) wurden die Folien mit Eisessig besprüht und 5 min bei 100° C getrocknet. Die Entfernungen der Protein-Banden vom Startpunkt wurden gemessen und in Abhängigkeit vom pH-Wert graphisch dargestellt (Abb. 12).

2.9.2. Präparative Elektrofokussierung

Mukoid wurde nach der Methode von MACKO und STEGEMANN (1970) in der Modifikation von ZECH und ZÖRCHER (1973) elektrofokussiert: Ein Polyäthylen-Schlauch (100 cm lang, 0,4 cm Durchmesser) wurde um eine Stahlstange (2,5 x 17 cm) gewickelt und an beiden Enden mit Stahlringen befestigt. Der Polyäthylen-Schlauch wurde mit einer 2 %igen Lösung von Ampholine (LKB-Produkter, Schweden, pH = 3-6) nach VESTERBERG und SVENSSON (1966) gefüllt, die 70 mg Mukoid/13 ml enthielten. Zwei Platinelektroden (2 cm lang) wurden auf beiden Seiten an den Schlauch angeschlossen und in die Ampholinelösung getaucht. Die Trennung wurde bei 0° C, 100 V, 90 h durchgeführt. Der Stromfluß fiel von 50 µA auf 2 µA ab. Nach Abschluß der elektrophoretischen Trennung wurde der Schlauch in flüssigem Stickstoff eingefroren und nachher mit einer Säge in kleine Abschnitte zerschnitten, die in Reagenzgläser zum Abtauen überführt wurden. Nach dem Abtauen der gefrorenen Fraktionen wurde in jeder Fraktion Proteingehalt und pH-Wert bestimmt und in ein Diagramm eingetragen.

2.10. Perjodat-Oxydation

Der stark J-blutgruppen-aktive Rest des Serums, der nach Entfernung der Lipoproteine durch Ultrazentrifugation übrig blieb, wurde mit Perjodat oxydiert und anschließend auf J-Aktivität untersucht: Der Serum-Rest (2 ml) wurde lyophilisiert und in 2 ml 0,1 M Phosphat-Puffer-Lösung (pH = 7,7) gelöst. Dazu wurden 2 ml einer 0,001 M $NaJO_4$-Lösung

gegeben. Die Lösung wurde bei Zimmertemperatur 1 h gerührt. Dann wurde, um überschüssiges Perjodat zu reduzieren (COFFIN et al., 1958; BIGLEY et al., 1958), unter Rühren wäßrige Glucose-Lösung (25 g Glucose und 30 g Natriumcitrat/l) zugesetzt und das Gemisch weitere 2 h gerührt. Dann wurde lyophilisiert, in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und 2 Tage gegen destilliertes Wasser bei 4^{o} C und anschließend einen Tag gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert. Die dialysierte isotonische Lösung wurde auf J-Aktivität geprüft.

2.11. J-Aktivitäts-Nachweis

Die J-Aktivität wurde (beim Serum direkt, bei Serumfraktionen nach Entfernung der anorganischen Beimischungen durch Dialyse) im Hämolysehemmungstest bestimmt. Hierbei macht man sich den hämolysierenden Effekt von Anti-J zunutze, der nach Zusatz von Komplement (Kaninchenserum) bei J^{cs}-Erythrozyten ("Testerythrozaten") erzielt wird. Die J-Aktivität der Probe wird durch Reaktion mit Anit-J bestimmt; hierbei blockieren die J-Determinanten die J-Antikörper, so daß diese mit nachfolgend zugegebenen Testerythrozyten nicht mehr reagieren können. Wird die Probesubstanz in fallenden Konzentrationen bei sonst konstanten Bedingungen verwendet, so reicht unterhalb einer gewissen Probenkonzentration die Zahl ihrer J-Determinanten nicht mehr aus, um alle Antikörpermoleküle zu blockieren, so daß es jetzt zur Hämolyse der Testerythrozyten kommt. Um zwischen verschiedenen Hämolysehemmungstests zuverlässige Vergleiche zu ermöglichen, ist auf Konstanz aller

Parameter (Probesubstanz und Testerythrozyten von den jeweils gleichen Blutentnahmen) zu achten; für alle Nachweise wurden im Titer gleichbleibendes, eingefrorenes und geprüftes Anti-J und ebenso geprüftes Komplement*) von Herrn Dr. J. Koch vom Tierärztlichen Institut der Universität Göttingen, geliefert und verwendet.

Die Versuchsanordnung wurde von THIELE et al. (1970) und SCHRÖFFEL et al. (1971) entwickelt. Wegen möglicher Aktivitätsschwankungen der Testerythrozyten, des Antiserums und des Komplements können die Ergebnisse der Hämolysehemmungstests nur innerhalb einer Versuchsreihe exakt verglichen werden.

Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Probesubstanz wurde mit Hilfe eines Glashomogenisators in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Dabei wurde die Konzentration im allgemeinen so gewählt, daß die in 1 ml der Suspension enthaltene Probe aus 1 ml ursprünglichem J^{cs}-Serum stammte; bei geringeren J-Aktivitäten wurden jedoch höhere Konzentrationen verwendet. In einer Reihe von 12 serologischen Röhrchen wurde die sogenannte Vorlage, d.h. eine Verdünnungsreihe der Probe, angesetzt. Hierzu wurden je 0,5 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung in jedes Röhrchen pipettiert. In das erste Röhrchen der Reihe wurden dann 0,5 ml der Probe-Suspension gegeben, gut gemischt und 0,5 ml dieser Mischung in das nächste Röhrchen pipettiert. Der so entstandene Abfall der Probekonzentration um den Faktor 1/2 wurde durch weitere Verdünnung von Röhrchen zu Röhrchen absteigend beibehalten. In einer zweiten

---

*) Nicht jedes Kaninchen ist zur Komplementgewinnung geeignet.

Röhrchenreihe (Antiserumreihe) wurde jedes Röhrchen mit 0,1 ml Anti-J-Serum beschickt. Je 0,2 ml der Probelösung wurden aus jedem Röhrchen der Vorlage dem entsprechenden der Antiserumreihe zugesetzt. Nach Schütteln wurden die Proben in einem Wasserbad inkubiert (37° C, 15 min) und wieder geschüttelt. Nach Zusetzen von 0,1 ml einer gewaschenen 1,5 %igen Testerythrozyten-Suspension und weiterer Inkubation (30 min) wurde je 0,1 ml Komplement zugesetzt. Während der weiteren Reaktionszeit (5 h) wurde noch dreimal nach je 100 min geschüttelt. Parallel zur Untersuchung der J-Aktivität wurden alle Komponenten des Tests auf Funktionsfähigkeit und Spontanhämolyse folgendermaßen geprüft:

1. Kontrolle der 0,9 %igen NaCl-Lösung:
   0,2 ml der NaCl-Lösung + 0,05 ml 1 %ige Erythrozyten-Suspension;
   Ergebnis: keine Hämolyse.

2. Kontrolle des Anti-J-Serums:
   0,1 ml NaCl-Lösung + 0,05 ml Anti-J-Serum + 0,05 ml Erythrozyten-Suspension + 0,05 ml Komplement;
   Ergebnis: komplette Hämolyse.

3. Komplement-Kontrolle:
   0,15 ml NaCl-Lösung + 0,05 ml Kaninchenkomplement + 0,05 ml Erythrozyten-Suspension;
   Ergebnis: keine Hämolyse.

4. Kontrolle auf spontan hämolysierende Beimischungen*) in der untersuchten Substanz:
   0,1 ml NaCl-Lösung + 0,2 ml unverdünnte Probeemulsion + 0,1 ml Erythrozyten-Suspension + 0,1 ml Anti-J-Serum;
   Ergebnis: keine Hämolyse.

---

*) z.B. Lysophosphatide, die sich spontan aus Phosphatiden bilden können, besonders, wenn das Lipid-Material zu lange oder nicht gekühlt aufbewahrt wurde.

Die Auswertung des Hämolysehemmungstestes erfolgte nach THIELE et al. (1970) und SCHRÖFFEL et al. (1971). Bei zunehmender Verdünnung der Probe steigt in einem bestimmten Bereich mit abnehmender Hämolysehemmung die Menge des freigesetzten Hämoglobins proportional an. Diese Proportionalität wurde bei der quantitativen Auswertung, die durch Spektralphotometrie des hämoglobinhaltigen Überstandes erfolgte, benutzt. Die Methode wurde ausführlich von KIRCHHOF (1972) beschrieben.

2.12. Elektrophorese

2.12.1. Elektrophorese in Agarose-Gel

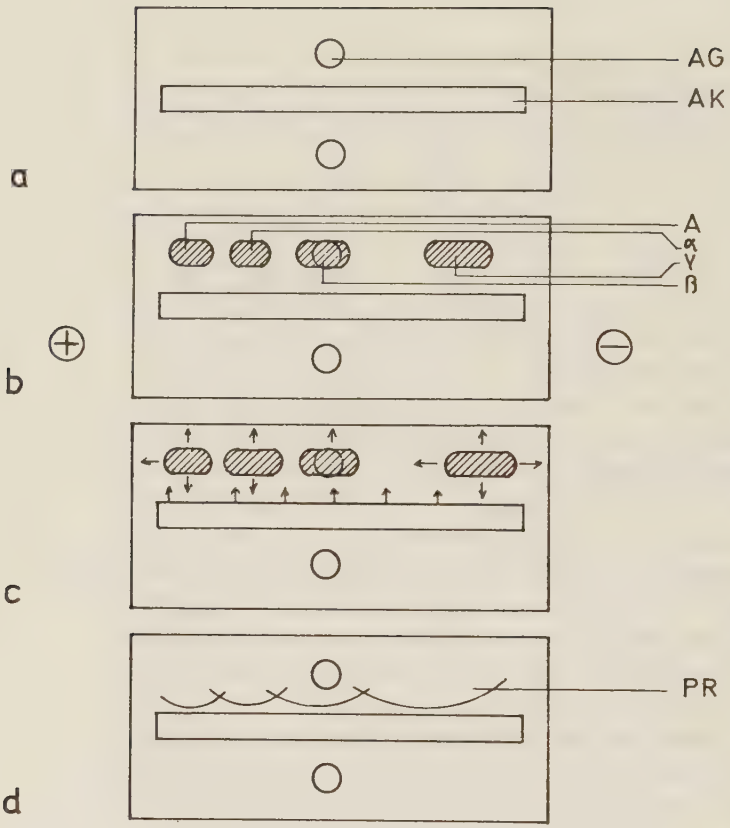
Die Trennung von Serumlipoproteinen wurde in Agarose-Gel vorgenommen. Hierzu diente die von URIEL et al. (1964) entwickelte und für klinische Zwecke erprobte Methode (PETZOLD, 1961). Handelsübliches, mit Natrium-Phosphat-Veronalpuffersubstanz vermischtes Agarosepulver (Serva, Instant-Gel-A, -08-82) wurde in dem vorgeschriebenen Volumen (100 ml) Wasser gelöst und im Wasserbad aufgekocht (RAPP und KAHLKE, 1968). Man ließ auf 60° C abkühlen und goß es auf eine horizontale Glasplatte (16 x 22 x 0,4 cm). Um ein Auslaufen des flüßigen Geles zu verhindern, war vorher auf die Glasplatte ein Gummirahmen geklebt worden. Auf diese Glasplatte wurden 60-70 ml des Geles gegossen, so daß die Höhe der Gelschicht 0,4 cm nicht überschritt. Nach Erstarren des Geles wurden 5 cm vom kathodischen Rand entfernt und im Abstand von 0,5 cm voneinander sieben Auftragsreservoire mit einer Querstanze

(1 x 0,3 cm) aus dem Gel ausgehoben. Fünf Reservoire wurden für die zu untersuchenden Proben, zwei weitere für das Kontrollgemisch (Albumin human, gefärbt mit Bromphenolblau und Vitamin B_{12}. Nr. 11885, Serva) gebraucht. Als Probelösung diente ein Gemisch von 0,2 ml der stark eingeengten Lipoprotein-Lösung mit 0,3 ml physiologischer Kochsalzlösung und 0,5 ml des noch flüssigen Agarose-Geles. Etwa 0,05 ml dieses Gemisches wurden in ein Reservoir gefüllt und mit einem Tropfen Gel abgedeckt. Die Kontrollsubstanz wurde in ähnlicher Weise aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einem Platten-Elektrophorese-Apparat (Fa. Desaga, Heidelberg; modifiziertes UGI-Gerät). Als Trennpuffer wurde der oben genannte Na-Veronal-HCl-Puffer (pH = 8,2; 0,05 M) benutzt. Die Trennung erfolgte bei einer Feldstärke von etwa 10 V/cm. Nach 2 h war die Elektrophorese beendet. Die Entfernung der Kontrollsubstanzen vom Startpunkt wurde gemessen und notiert. Zur Färbung wurde die Platte mit 2 %iger Eisessiglösung überschichtet und 30 min auf einer Wippe bewegt. Danach wurde mit Filterpapier abgedeckt und unter einem Ventilator über Nacht getrocknet. Die Färbung der Lipoproteine wurde nach der Methode von URIEL et al. (1964) durchgeführt: In 100 ml (80 %igem Alkohol wurde 0,1 g Sudanschwarz (Serva reinst, C.I. Solvent Black 3, Nr. 26150) gelöst, die Lösung kurz gekocht und filtriert. Die Glasplatte wurde mit der Lösung überschichtet und 3 h auf der Wippe gefärbt. Die anschließende Entfärbung erfolgt mit 50 %igem Äthanol innerhalb von 2-5 min. Die Trennung der Lipoproteine nach der Fraktionierung mit Sephadex G-200 erfolgte auf ähnliche Weise mit einem LKB-Gerät mit sechs Glasplatten (2,5 x 25 x 0,1 cm)

pro Lauf; Gelschicht 0,2 cm hoch, Volumen des untersuchten Gemisches jeweils 0,05 ml. Die sonstigen Bedingungen waren identisch mit denen des oben genannten Verfahrens.

2.12.2. Immunoelektrophorese

Die Immunoelektrophorese erfolgt in zwei Schritten: der elektrophoretischen Auftrennung der Probe und der Immunodiffusion (BACKHAUSZ, 1967; CAWLEY, 1969). Der erste Schritt wurde nach dem unter 2.12.1. beschriebenen Verfahren mit dem LKB-Gerät durchgeführt. Die Antigen-Probe (Gesamtserum, die mit Dextransulfat fällbaren Lipoproteine und der mit Dextransulfat nicht fällbare Serumrest) wurde in der Mitte jeder Glasplatte (26 x 76 mm) aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Antiserum in den Antikörper-Graben eingefüllt. Die Platten wurden 24 h bei 37° C inkubiert. Antigen und Antikörper diffundieren in dieser Zeit nach allen Richtungen in die Gelschicht und kommen miteinander in Berührung. Dort, wo sich äquivalente Konzentrationen von gelöstem Antigen und entsprechendem Antikörper finden, kommt es zur Präzipitation (Abb. 6).
Gleich nach dem Gießen der Glasplatten mit Agarosegel wurden mit dem Gelschneider je zwei Löcher für das Antigen und je eine Rinne für den Antikörper in das Gel gestanzt. Die in den Löchern gebliebenen Agarstücke wurden mit der Wasserstrahlpumpe ausgesaugt. Die zu analysierende Probe wurde mit einer Mikropipette in die Löcher eingefüllt (Probemenge etwa 3 µl).
Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Probe, die etwa 70 min dauerte, wurden die vorgestanzten



AG = Antigen-Behälter
α = α-Globulin
γ = γ-Globulin
A = Albumin
AK = Antikörper-Graben
ß = ß-Globulin
PR = Präzipitations-Bande

a = Stanzen der Gelschicht
b = I. Schritt: Elektrophorese
c = II. Schritt: Immunodiffusion
d = Ergebnis nach Färbung des präzipitierten Antigen-Antikörper-Komplexes

Abb. 6: Schematische Darstellung der Immunoelektrophorese

Antikörper-Graben mit dem Gelmesser ausgehoben und etwa 80 µl Immunserum (Anti-Gesamtserum vom Kaninchen) eingefüllt. Die Immunodiffusion erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37° C binnen 24 h. Die nicht präzipitierten Proteine wurden durch Schwenken in einer Schale mit physiologischer Kochsalzlösung innerhalb von 20 h entfernt. Anschließend wurden die Proben 1 Stunde lang in destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde mit nicht fasernden Filterpapierstreifen, die mit destilliertem Wasser angefeuchtet worden waren, bedeckt und 20 Stunden bei Zimmertemperatur getrocknet. Die Färbung wurde wie unter 2.12.1. nach der Methode von URIEL et al. (1964) durchgeführt.

2.12.3. Elektrophorese in Polyacrylamid

Eine Technik zur ein- und zweidimenionalen Polyacrylamid-Elektrophorese hatten STEGEMANN et al. (1973) für die Trennung von Kartoffelproteinen beschrieben. In der vorgelegten Arbeit wurde die von STEGEMANN (1970) beschriebene Arbeitsweise benutzt. Als Träger diente 7 %ige Cyanogum (7 % Acrylamid mit N,N'-Methylenbisacrylamid) in 0,125 M Tris-Borat-Puffer (ph = 8,9). Vor Gebrauch wurde dem Puffer 3,9 g EDTA-Na_2 zugesetzt (LOESCHCKE und STEGEMANN, 1966). Auf eine Gelplatte (18 x 13 x 0,5 cm) wurden acht Proben in vorgefertigte Löcher (1 x 0,1 cm) aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei 500 V und 6° C in der Kühlzelle und dauerte 3 h. Die Proteine im Gel ließen sich mit Coomassie-Blue nach der Vorschrift von STEGEMANN (1970) anfärben.

3. ERGEBNISSE

3.1. Serumlipide

Die beabsichtigen quantitativen Bestimmungen der J-Aktivität in verschiedenen Lipoprotein-Fraktionen des Blutserums und ihren Lipiden setzt voraus, daß man sich zunächst Klarheit über die Höhe und Konstanz des Gehaltes an Gesamtlipiden und Lipidfraktionen des Serums verschafft. Während der Gesamtlipidgehalt der Erythrozytenmembranen bei allen Säugetieren eine bemerkenswerte Konstanz aufweist, ist der Lipidgehalt des Blutserums speziesspezifischen, genetischen, jahreszeitlichen, und Nahrungseinflüßen unterworfen.

Um die während der gesamten Untersuchung notwendigen quantitativen Lipidextraktionen experimentell in die Hand zu bekommen, wurde die Konzentration der Gesamtlipide der Erythrozytenmembran verschiedener Säugetiere bestimmt (Tab. 3). Aus zahlreichen Untersuchungen verschiedener Autoren geht hervor, daß die Lipide der Erythrozyten ausschließlich in ihren Membranen lokalisiert sind, so daß man, wie es in diesem Falle geschehen ist, zur Bestimmung der Membranlipide Gesamterythrozyten extrahieren und das Ergebnis auf die Volumeneinheit gepackter Zellen beziehen kann. Die Ergebnisse (Tab. 3) stimmen hinreichend genau mit Literaturwerten überein (VAN DEENEN und DE GIER, 1964).

Da die Extraktion und die quantitative Bestimmung von Gesamtlipiden verhältnismäßig kompliziert ist und viele Einzelmanipulationen erfordert, ist dieses Verfahren mit größeren methodischen Fehlern be-

Tab. 3: Gesamtlipid-Bestimmung in Erythrozyten von Rind, Schaf, Schwein und Mensch (Vergleich).

Spender Blutgruppe Nr.	Hämato- krit*) %	Gesamtlipid		
		mg	Einzelwerte	Mittel
			mg/ml	g.Z.
Kuh J^{cs} 462	36 36	45,8 41,4	6,36 5,76	6,06
Rind J^{a} 233	37 37 37	46,1 40,2 46,8	6,20 5,43 6,33	5,98
Rind J^{s} 237	47 47	59,6 58,7	6,34 6,24	6,29
Schaf R^{+} 1	46 46	57,4 58,3	6,23 6,33	6,28
Schwein A^{-} 87	57,5 57,5 57,5	75,2 71,1 71,1	6,53 6,18 6,23	6,31
Schwein A^{+} 2	44 44	57,3 57,1	6,51 6,48	6,49
Mensch 0 Rh^{+}	44 44	50,2 49,2	5,70 5,61	5,65

* Volumen der eingesetzten Erythrozytensuspensionen betrug in allen Fällen 20 ml.

haftet als viele andere chemische Bestimmungsmethoden. Vor allem hängt die Genauigkeit von der Größe der Auswaage der Gesamtlipide ab; im allgemeinen ist bei zu geringen und bei zu großen Auswaagen mit zu hohen Werten zu rechnen. Bei zu geringen Auswaagen macht sich nämlich der Wägefehler bemerkbar, und es ist auch damit zu rechnen, daß mitextrahierte Fremdstoffe einen relativ hohen Anteil ausmachen. Zu hohe Auswaagen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen, weil der Trocknungsvorgang bei dem gewählten Standardverfahren zu nicht hinreichend lösungsmittelfreien Produkten führen kann. Um den für die Bestimmung geeigneten Bereich von Einwaagen und damit auch von Auswaagen zu ermitteln, wurde eine Bestimmungsreihe angesetzt, bei welcher von derselben Serumprobe verschiedene Einwaagen verwendet wurden (Tab. 4). Da im Verlaufe der weiteren Arbeit auch

Tab. 4: Kontrolle der Genauigkeit der Gesamtlipid-Bestimmung. Extraktion von frischem Serum und des gleichen Serums nach Gefriergetrocknung (Rind Nr. 200).

Probe	Serum ml	Gesamtlipid		
		mg	mg/100 ml Serum	
			Einzelwerte x	Mittel $\bar{x} \pm \sigma$
A	10	46,2	462,0	
B	15	69,1	460,2	
C	20	92,8	464,0	461,5 ± 3,34
D	25	115,0	460,0	
E	10	46,0	460,0	
F	15	68,8	458,2	
G	20	92,2	461,0	460,2 ± 2,53
H	25	115,4	461,6	

A B C D = Proben von frischem Serum
E F G H = Proben von Serum nach Gefriertrocknung

getriergetrocknete Proben zur Untersuchung gelangen sollten, wurden auch Extraktionsversuche an gefriergetrocknetem Serum durchgeführt; hierzu diente dasselbe Serum (Tab. 4). Wie die Ergebnisse in Tab. 4 zeigen, gibt es bei sorgfältiger Ausführung der Extraktion und gravimetrischen Bestimmung der Gesamtlipide nur geringe Abweichungen, die in beiden Versuchsreihen unter 1 % des jeweiligen Mittelwertes liegen.

Ergebnisse von serienmäßigen Bestimmungen von freien und Gesamtcholesterin enthält Tab. 15, solche von Protein und Glycerid-Glycerin zeigt Tab. 5. Zur Glycerinbestimmung diente die für humanmedizi-

Tab. 5: Gesamtprotein und Glycerid-Glycerin von 10 Rinderseren (Schlachthofblut). Jede Bestimmung (LOWRY et al., 1951 bzw. SCHMIDT et al., 1968) wurde doppelt durchgeführt.

Tier-Nr.	Protein g/100 ml	Glycerid-Glycerin mg/100 ml
25	5,55	2,37
26	6,60	2,37
27	7,35	2,56
28	10,50	2,56
29	7,50	1,66
30	5,75	1,60
31	8,55	2,05
32	6,30	1,98
33	5,60	2,63
34	7,00	2,95
Mittel $\bar{x}$ (mit σ)	7,09 ± 1,53	2,27 ± 0,44

nisch-diagnostische Routineuntersuchungen übliche Methode zur Direktbestimmung am Serum mit einer käuflichen Test-Kombination. Es fällt auf, daß diese Werte wesentlich niedriger sind als dies vom menschlichen Blutserum bekannt ist. Daher wurden auch bei 2 Rinderseren Glycerid-Glycerin-Bestimmungen am extrahierten Gesamtlipid durchgeführt und mit der direkten Bestimmung verglichen (Tab. 6). Dabei zeigte sich, daß die Glycerin-Bestimmung am extrahierten Gesamtlipid Werte ergibt, die in der gleichen Größenordnung liegen, wie im menschlichen Serum, die direkte Bestimmung

Tab. 6: Bestimmung von Glycerid-Glycerin im Rinderserum von Schlachthofblut. n = 3

Probe	Gesamtlipid	Glycerid-Glycerin am Gesamtlipid bestimmt		Glycerid-Glycerin direkt bestimmt
	mg/100 ml	% des Gesamtlipids	mg/100 ml Serum	mg/100 ml Serum
Serum Rind Nr. 35	468,0	3,86	18,1	1,15
Serum Rind Nr. 36	458,7	3,79	17,4	1,34

jedoch viel zu geringe Werte. Da die direkte Glycerin-Bestimmung am menschlichen Serum einwandfrei funktioniert, ist anzunehmen, daß das Rinderserum einen

Stoff enthält, der einen der Teilprozesse der enzymatischen Glycerin-Bestimmung hemmt, der jedoch in den extrahierten Gesamtlipiden nicht mehr zugegen ist.

Genetische und jahreszeitliche Einflüsse auf den Lipidspiegel des Blutserums des Rindes, vor allem dessen Cholesterin- und Phosphatidgehalt, wurden beschrieben (O'KELLY, 1973). Die jahreszeitlichen Abweichungen (O'KELLY, 1972, 1973a) können ebenso auf Nahrungseinflüße wie auch auf klimatische Einflüsse zurückgeführt werden. Die von mir durchgeführten Untersuchungen wurden an Rindern beiderlei Geschlechts und verschiedener Rassen durchgeführt. Der genetische Einfluß auf die Lipidzusammensetzung des Serums dürfte jedoch nicht sehr groß sein, da alle verwendeten Tiere den sogenannten Niederungsrassen angehörten. Um genetische und Umwelteinflüsse bei den beabsichtigten Versuchen möglichst auszuschalten, wurden einzelne Versuchsserien möglichst an demselben Tier durchgeführt. Aus der menschlichen Physiologie ist bekannt, daß der Gesamtlipidspiegel des Serums in erheblichem Maße von der Nahrungsaufnahme abhängt. Der Gesamtlipidspiegel des Serums hat bei nüchternen Versuchspersonen einen Minimalwert; er steigt nach einer Fettmahlzeit stark an und fällt im Verlaufe von Stunden allmählich wieder ab, so daß in der medizinischen Diagnostik, wenn es um die Bestimmung der Konzentration der Gesamtlipide oder gewisser Lipidfraktionen im Serum geht, stets Serum nach einer 12-stündigen Fastenzeit verwendet wird. Beim Rind läßt sich eine solche Fastenzeit nicht durchführen, zumal sie beim Wiederkäuer wahrscheinlich viel länger bemessen werden müßte.

Andererseits ist möglicherweise die Kinetik der gesamten Lipidresorption im Darmkanal beim Wiederkäuer völlig anders als beim Menschen; denn beim Wiederkäuer werden die mit der Nahrung aufgenommenen Lipide bereits im Pansen einer Reihe von mikrobiellen Abbauprozessen unterworfen, deren Produkte bereits im Pansen resorbiert werden können, während beim Menschen die Verdauung und Resorption der Lipide erst im proximalen Dünndarm vor sich geht und für die Kinetik die Konzentration

Tab. 7: Gesamtlipide und Neutrallipide des Rinderserums zu verschiedenen Tageszeiten. Jede Bestimmung wurde doppelt durchgeführt.

Tier	Zeit	Gesamtlipide	Neutrallipide	
		$\frac{mg}{100\ ml} \pm \sigma$	$\frac{mg}{100\ ml} \pm \sigma$	% der Gesamtlipide
Laktierende Kuh Nr. 1 J^{cs}	Mo	462,7 ± 15,5	242,5 ± 8,0	52,4
	Mi	396,5 ± 1,0	203,5 ± 16,0	51,3
	Ab	399,0 ± 3,0	230,7 ± 4,5	57,8
Färse Nr. 1 J^{cs}	Mo	440,7 ± 0,5	241,9 ± 3,5	54,7
	Mi	439,7 ± 4,5	232,2 ± 6,5	52,8
	Ab	429,5 ± 9,0	255,7 ± 5,5	59,5
Färse Nr. 2 J^{a}	Mo	467,5 ± 5,0	260,4 ± 0,9	55,7
	Mi	484,2 ± 18,5	263,5 ± 6,0	54,4
	Ab	455,5 ± 7,0	259,2 ± 5,5	56,9
	Mo**	518,7 ± 5,6	279,7 ± 2,5	53,9

Mo = 8 Uhr Mi = 13 Uhr Ab = 18 Uhr

** am folgenden Tag

der Pankreaslipase und die Emulgier-Wirkung der gallensauren Salze maßgebend ist. Die Kinetik der Fettverdauung beim Wiederkäuer ist bisher noch ungenügend untersucht worden. Wegen des Wiederkäuprozesses ist eher mit einer kontinuierlichen Resorption aller möglichen Nährstoffe zu rechnen, so daß Tagesschwankungen des Lipidspiegels des Serums weniger deutlich sein dürften als beim Menschen. Um dies zu prüfen, wurde an 3 Tieren der Gesamtlipidgehalt und der Gehalt bestimmter Lipidfraktionen im Blutserum während eines Tagesablaufes bestimmt. Das Ergebnis zeigt Tab. 7, für den Lipid-Phosphor Tab. 8, für das Gesamtcholesterin Tab. 9 und Tab. 10 für den Lipidzucker und das Lipid-

Tab. 8: Phosphor-Gehalt der polaren Lipide des Serums zu verschiedenen Tageszeiten. Jede Bestimmung wurde 4 mal durchgeführt.

Tier	Zeit	Lipid-Phosphor	
		% der polaren Lipide	$\frac{mg}{100\ ml\ Serum} \pm \sigma$
Laktierende Kuh Nr. 1 J^{cs}	Mo	2,64	5,81 ± 0,06
	Mi	2,77	5,59 ± 0,04
	Ab	3,14	5,29 ± 0,03
Färse Nr. 1 J^{cs}	Mo	2,71	5,41 ± 0,02
	Mi	2,56	5,31 ± 0,02
	Ab	3,25	5,73 ± 0,03
Färse Nr. 2 j^{a}	Mo	3,45	7,13 ± 0,08
	Mi	3,31	7,32 ± 0,07
	Ab	2,75	5,41 ± 0,07
	Mo*	2,99	7,15 ± 0,03

Mo = 8 Uhr Mi = 13 Uhr Ab = 18 Uhr

* am nächsten Tag

hexosamin. Hierbei wurden zwei Färsen ausgewählt sowie eine laktierende Kuh, da der Lipidgehalt des Serums während des Laktationsprozesses höher sein soll als in anderen Lebensphasen. Die erwähnten Tabellen zeigen, daß der Lipidspiegel im Serum trotz einiger Differenzen während eines Tagesablaufes tatsächlich eine größere Konstanz aufweist als beim Menschen nach einer Fettmahlzeit (THIELE, 1953). Der Gang der Konzentration der Gesamtlipide sowie der Neutrallipide und polaren Lipide bei den untersuchten 3 Tieren ist auch an einem Diagramm (Abb. 7) dargestellt. Lediglich im Lipidzucker- und im Lipid-

Tab. 9: Cholesterin-Gehalt der Neutrallipide des Serums zu verschiedenen Tageszeiten. Jede Bestimmung wurde 4 mal durchgeführt.

Tier	Zeit	Gesamtcholesterin	
		% der Neutrallipide	mg / 100 ml Serum ± σ
Laktierende Kuh Nr. 1 J^{cs}	Mo	69,1	167,8 ± 11,04
	Mi	69,3	140,9 ± 11,35
	Ab	57,8	127,1 ± 11,63
Färse Nr. 1 J^{cs}	Mo	59,4	143,8 ± 6,38
	Mi	59,4	137,9 ± 6,04
	Ab	56,8	150,4 ± 10,18
Färse Nr. 2 j^{a}	Mo	60,5	157,7 ± 2,31
	Mi	54,3	143,0 ± 8,95
	Ab	61,3	159,0 ± 3,12
	Mo**	59,1	165,1 ± 6,83

Mo = 8 Uhr Mi = 13 Uhr Ab = 18 Uhr

** am nächsten Tag

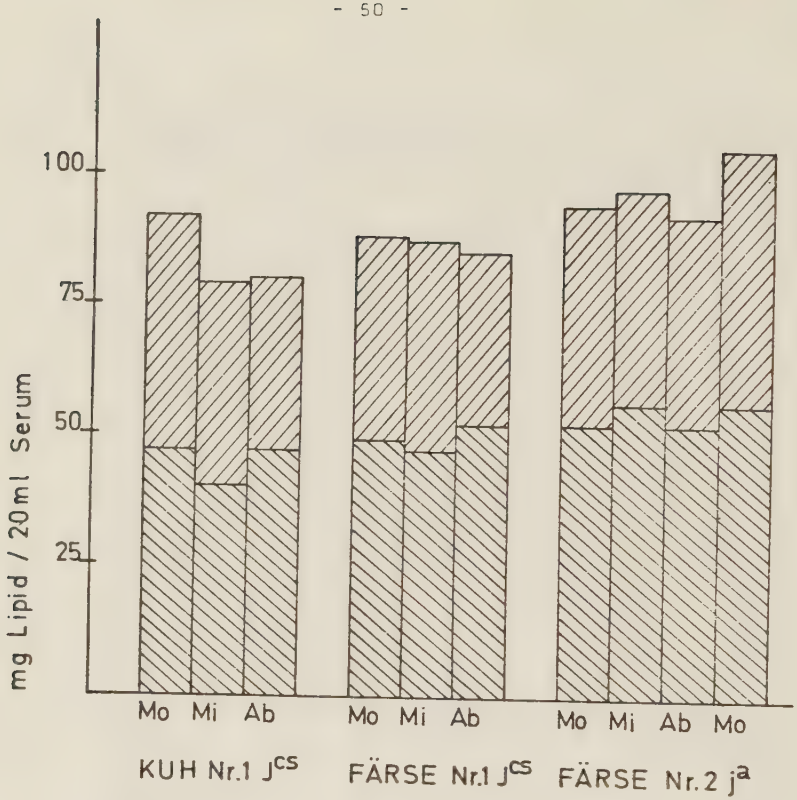
Tab. 10: Zucker- und Hexosamin-Gehalt der polaren Lipide des Serums zu verschiedenen Tageszeiten. Bestimmung von Zucker wurde 4 mal, von Hexosamin 2 mal durchgeführt.

	Zeit	Zucker		Hexosamin	
		% der polaren Lipide	mg / 100 ml Serum ± σ	% der polaren Lipide	mg / 100 ml Serum
Lactierende Kuh Nr. 1	Mo	0,69	1,91 ± 0,09	0,10	0,22
	Mi	0,54	1,05 ± 0,13	0,15	0,29
	Ab	0,76	1,28 ± 0,07	0,16	0,30
Färse Nr. 1	Mo	0,76	1,58 ± 0,11	0,1.	0,30
	Mi	0,67	1,40 ± 0,04	0,0.	0,18
	Ab	0,86	1,77 ± 0,04	0,0.	0,13
Färse Nr. 2	Mo	0,62	1,36 ± 0,12	0,16	0,37
	Mi	0,55	1,21 ± 0,19	0,17	0,37
	Ab	0,79	1,01 ± 0,07	0,13	0,27
	Mo*	0,55	1,32 ± 0,18	0,19	0,46

Mo = 8 Uhr Mi = 13 Uhr Ab = 18 Uhr

*am nächsten Tag

hexosamingehalt der 3 untersuchten Rinder sind im Tagesverlauf stärkere Abweichungen festzustellen; die entsprechenden Werte beim Menschen sind meines Wissens noch nicht bestimmt worden.



Mo = 8 UHR

Mi = 13 UHR

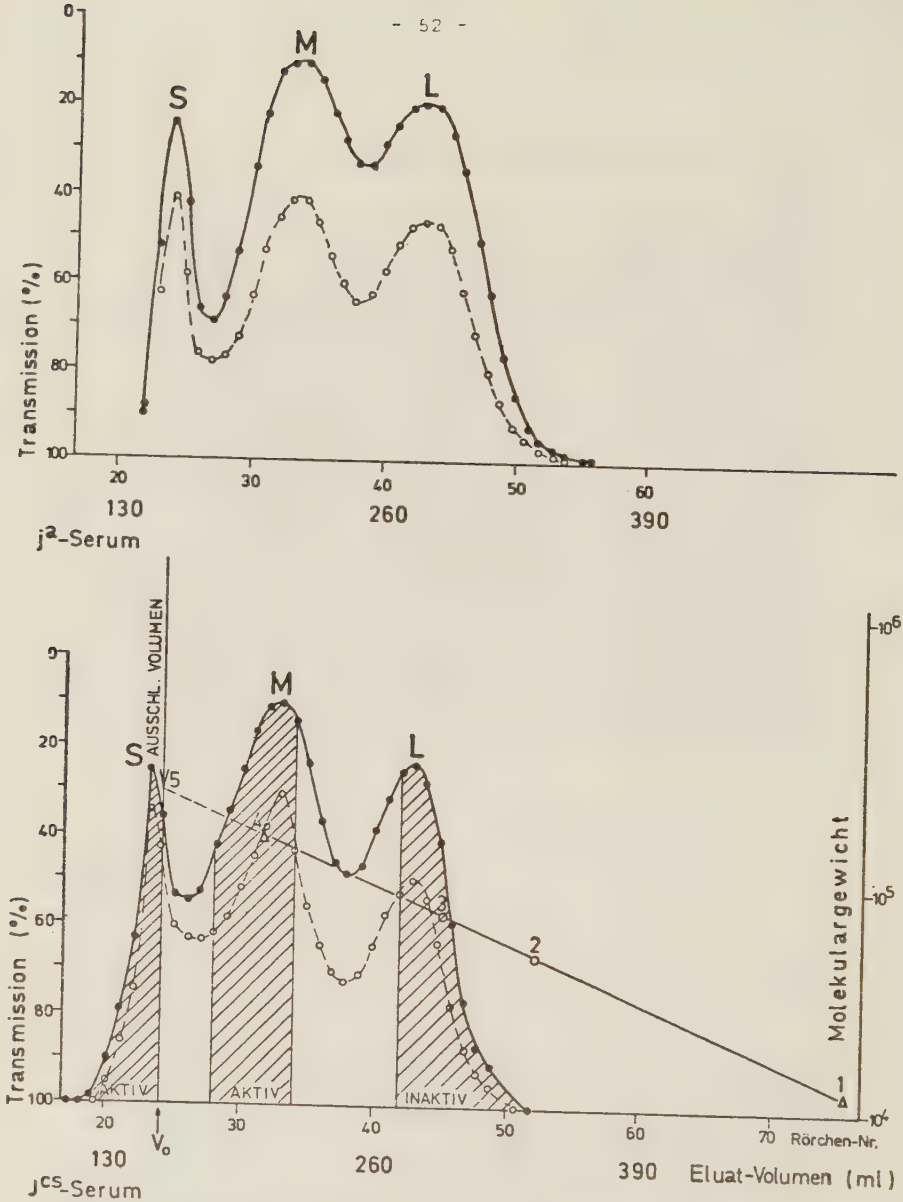
Ab = 18 UHR

Abb. 7: Lipidgehalt des Serums zu verschiedenen Tageszeiten.

3.2. Serumfraktionierung durch Gelfiltration

Durch frühere Untersuchungen (SCHRÖFFEL et al., 1971) war bekannt, daß die J-Aktivität des Serums in mindestens 2 Fraktionen anzutreffen ist, nämlich einerseits in den mit Chloroform-Methanol-Gemischen extrahierten Gesamtlipiden, andererseits in dem proteinhaltigen Rückstand, der nach der Extraktion der Gesamtlipide zurück bleibt. Da die Lipide im Blutserum in Form von Lipoproteinen gelöst sind und diese erfahrungsgemäß besonders hochmolekulare Substanzen darstellen, erschien die Fraktionierung der im Rinderserum gelösten Stoffe nach ihrem Molekulargewicht mit Hilfe eines Molekularsiebes lohnend, um festzustellen, ob die J-Aktivität in verschiedenen Fraktionen, die auf Grund ihrer Molekulargewichtsklassen getrennt wurden, zu finden ist. Zu dieser Fraktionierung diente die Gelfiltration.

Abb. 8 zeigt das Ergebnis einer solchen Fraktionierung am J^{cs}-Serum und zum Vergleich auch an einem j^{a}-Serum. In diesen Diagrammen wurde die Licht-Transmission bei je 254 nm und 280 nm gegen die entsprechenden Eluat-Fraktionen aufgetragen. Bei 280 nm wird das Licht fast ausschließlich von aromatischen Ringsystemen absorbiert, wie sie in den Serumproteinen vorliegen; der Kurvenverlauf bei 280 nm ist daher der Proteinkonzentration weitgehend proportional. Bei 254 nm absorbieren dagegen auch Nucleinsäuren, Lipoproteine und einige andere Substanzen. Da das Elutionsvolumen für das Molekulargewicht der eluierten Substanz charakteristisch ist, kann mit Hilfe der Gelfiltration eine angenährte Molekulargewichtsbestimmung durchgeführt werden, wenn Vergleichs-



1. Cytochrom C (MG=12400)
2. Hühnereialbumin (MG=45000)
3. Rinderserumalb. (MG=67000)
4. Human-γ-Globulin (MG=160000)
5. Dextranblau (MG=2.10^6)

o--o Messung bei 254 nm
●—● Messung bei 280 nm

Abb. 8: Gelfiltration von 2 ml j^a-Serum (oben) bzw. 2 ml J^{cs}-Serum (unten). Die optische Transmission (%) ist gegen des Eluat-Volumen (ml) aufgetragen.

substanzen, deren Molekulargewichte bekannt sind, durch dieselbe Gelsäule filtriert werden. Zwischen dem Logartihmus der Molekulargewichte und dem Eluationsvolumen besteht eine lineare Beziehung, wie in Abb. 8 erkenntlich ist.

Wie menschliches Serum (MÜLLER, 1968) ist mit diesem Verfahren auch Rinderserum in 3 Fraktionen zerlegbar. Auf Grund der Kalibrierung der Gelsäule mit Substanzen, deren Molekulargewichte bekannt waren, kann man auch hier - wie bei der Fraktionierung von menschlichem Serum - dem ersten Gipfel (S = schwere Fraktion) Molekulargewichte von über $1{,}6 \times 10^5$ zuordnen, dem mittleren Gipfel (M = mittlere Fraktion) Molekulargewichte um $1{,}6 \times 10^5$, dem dritten Gipfel (L = leichte Fraktion) Molekulargewichte um 7×10^4. In der L-Fraktion finden sich offensichtlich vorwiegend die Albumine, in der S-Fraktion Makroglobuline und Lipoproteine. Da sich die 3 Fraktionen überlappen, wurden Eluatröhrchen jeder Fraktion derart vereinigt, daß die 3 so gewonnenen Sammelfraktionen frei von Teilen der sich überlagernden Nachbarfraktionen waren, wie in Abb. 8 angedeutet. Die Sammelfraktionen wurden quantitativ auf J-Aktivität untersucht. Dabei fand man eine starke Aktivität in der S-Fraktion, eine etwas geringere in der M-Fraktion, dagegen keine Aktivität in der L-Fraktion, wie aus den Hämolysekurven (Abb. 9) hervorgeht. Dieses Ergebnis stellt allerdings nur eine grobe Annäherung dar, da die sich überlagernden Einzelfraktionen nicht berücksichtigt wurden.

Daß in der S-Fraktion tatsächlich die im Serum vorherrschenden Lipoprotein-Klassen angereichert sind, zeigt die Lipoprotein-Elektrophorese der 3 durch Gel-

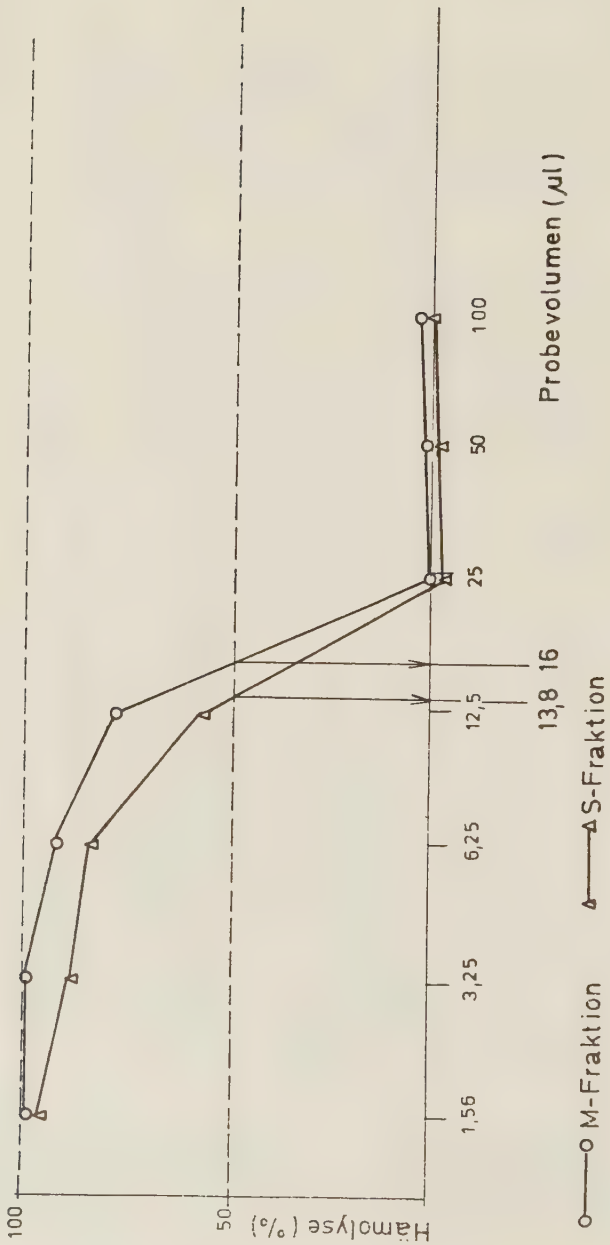


Abb. 9: Bestimmung der J-Aktivität der M- und S-Fraktion nach Gelfiltration von J^{cs}-Serum. Angegeben ist das Ausmaß der Hämolyse (%) von J^{cs}-Testerythrozyten als Funktion des Probevolumens jeder auf je 0,7 ml in der Kollodiumhülse eingeengten Fraktion.

filtration erhaltenen Fraktionen im Vergleich zu derjenigen des Serums (Abb. 10).

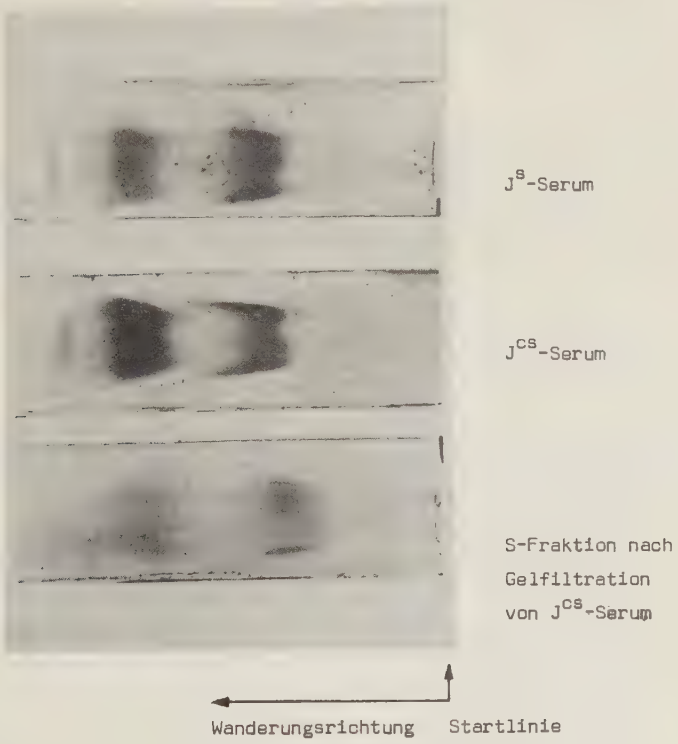


Abb. 10: Lipoprotein-Elektrophorese in Agarose-Gel bei pH 8,2. Lipidfärbung mit Sudanschwarz B.

Im Lipoprotein-Elektropherogramm der S-Fraktion sind die gleichen mit einem Lipidreagens färbbaren Zonen zu erkennen, wie im entsprechenden Elektropherogramm des Serums, während die Elektropherogramme der M- und

L-Fraktion (nicht in Abb. 10 dargestellt) frei von solchen Zonen sind. Die schwächere Färbung der Zonen der S-Fraktion in Abb. 10 ist auf die unterschiedlichen Konzentrationsverhältnisse zurückzuführen.

In weiteren Experimenten wurde versucht, durch Änderung der Säulendimensionen, Gelmengen und Eluationsvolumina die 3 Fraktionen ohne Überlappung zu eluieren; dies gelang verständlicherweise jedoch nicht.

3.3 Serummukoide

Die Extraktion von Mukoiden aus Erythrozytenstroma wurde schon mehrfach beschrieben (KLENK und UHLENBRUCK, 1958, 1958a, 1960; UHLENBRUCK und SCHMID, 1962), die aus Rinderserum m.W. jedoch noch nicht. Wie Tab. 11 zeigt, ist die Ausbeute von Mukoiden aus Erythrozytenstroma (bezogen auf 100 ml gepackte Zellen) stets viel größer als die aus Serum (bezogen auf 100 ml Serum). Vergleicht man die bei verschiedenen Rindern gewonnenen Ausbeuten an Serummukoiden, so fällt auf, daß diese bei Rindern des Typs J^s ca. fünfmal größer ist als bei Rindern des Typs j^a, während bei J^{cs}-Rindern die Ausbeute nur 1,8 mal größer ist als bei Typ j^a. Ob diesen Ausbeuteunterschieden eine Bedeutung hinsichtlich der Blutgruppenzugehörigkeit zukommt oder ob sie nur zufällig sind, sei dahingestellt.

Bestimmt man den Proteingehalt der isolierten Mukoide, so sind die dadurch erzielten Ergebnisse, wenn sie

Tab. 11: Ausbeute an Mukoiden durch Extraktion von Stroma bzw. Serum mit Phenolwasser bei verschiedenen Rindern.

Tier	Blut-gruppe	Erythrozyten-suspension ml	Hämato-krit %	Mukoid mg	Mukoid mg / 100 ml g. Z.
ERYTHROZYTENSTROMA					
Rind					
Nr. 1	J^{cs}	300	49	125,4	85,3
Nr. 2	j^{a}	450	67	298,5	44,4
	Serum (ml)	**SERUM**			mg / 100 ml Serum
Rind					
Nr. 9	J^{s}	1250		161,6	12,9
Nr. 10		1180		170,5	14,4
Nr. 2	j^{a}	950		27,9	2,9
Nr. 11		690		16,6	2,4
Nr. 12	J^{cs}	1000		41,3	4,1
Nr. 1		950		55,6	5,8
Nr. 13		960		40,5	4,2
Nr. 14		850		38,4	4,5
Kalb					
Nr. 1	J^{cs}	1010		64,2	6,3

Tab. 12: Ergebnisse der Mukoidanalysen. Nach SCHRÖFFEL et al. (1971a)

Tier	Blutgruppe	Präparation aus	Protein	Zucker	Hexosamin	Neuraminsäure
			mg/100 ml g.Z.	mg/mg Mukoid-Protein		
Rind Nr. 1	J^{cs}	Erythrozyten	8,01	1,32	0,70	0,66
Nr. 2	j^{a}	Erythrozyten	8,36	1,55	0,44	0,80
			mg/100 ml Serum)			
Rind Nr. 2	j^{a}	Serum	0,32	0,63	0,40	0,18
Nr. 1	J^{cs}	Serum	0,60	0,53	0,34	0,16
Nr. 9	J^{s}	Serum	0,23	0,54	0,56	0,24

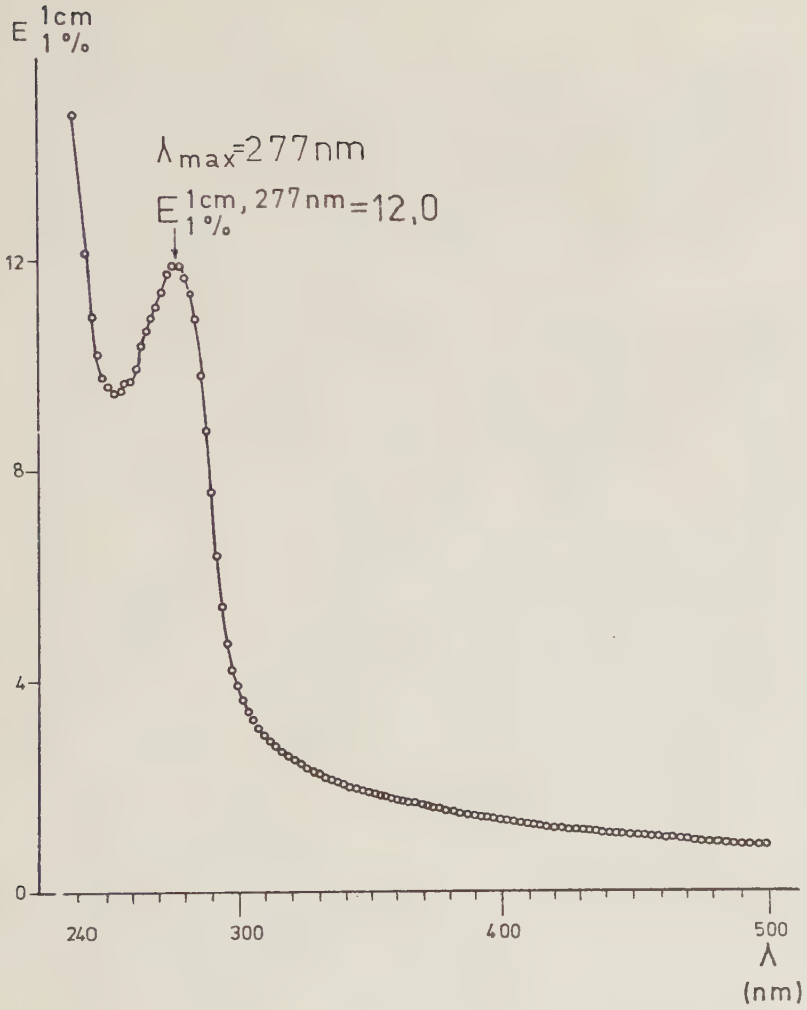


Abb. 11: UV-Spektrum von Serummukoid in wäßriger Lösung. Die Konzentration der Mukoidlösung bezieht sicht auf den nach LOWREY et al. (1951) bestimmten Proteingehalt.

auf 100 ml gepackte Zellen bzw. auf 100 ml Serum bezogen werden, wahrscheinlich besser untereinander vergleichbar als die Ausbeuten. Die Ergebnisse einiger solcher Bestimmungen zeigt Tab. 12. Darin sind auch Ergebnisse der chemischen Bestimmung von Zucker, Hexosamin und Neuraminsäure, die auf jeweils 1 mg Mukoid-Protein bezogen sind, enthalten. Zur Charakterisierung der Serummukoide wurden einige Lösungsversuche angestellt, deren Ergebnisse in Tab. 13 zusammengefaßt sind. Das UV-Spektrum des Serummukoids ist in Abb. 11 dargestellt.
Zur weiteren Charakterisierung der Serummukoide wurde eine elektrophoretische Trennung auf Acetatfolie durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß das Mukoidpräparat aus 2 Hauptfraktionen besteht (Abb. 12) und einer Reihe von schwächer färbbaren, verwaschenen Zonen, die ohne scharfe Grenze ineinander übergehen. In Abb. 12 sind nur die Hauptbanden dargestellt. Nach Ausführung der Elektrophorese bei verschiedenen Puffer-pH-Werten ließ sich durch graphische Interpolation der isoelektrische Punkt der beiden Hauptfraktionen bestimmen. Wie ebenfalls Abb. 12 zeigt, liegen diese beiden Punkte bei pH = 4,3 und pH = 4,64.

Ferner wurde das Serummukoid-Präparat einer Elektrofokussierung unterworfen. Das Ergebnis (Abb. 13) zeigt in noch deutlicherer Weise die Heterogenität des Präparates. Auch hier finden sich zwei Hauptfraktionen, die ähnliche isoelektrische Punkte aufweisen wie die bei der Elektrophorese bestimmten.

Die J-Aktivität des Serummukoid-Präparates wurde in einem Falle quantitativ bestimmt und mit der J-Aktivi-

Tab. 13: Fällungsversuche mit Serummukoid

MUKOID	REAGENS	E R G E B N I S
25 mg Rohmukoid	$HClO_4$ 0,6 M 2 ml	gut löslich
12 mg/2 ml H_2O	Trichloressigsäure (25 %) 2 ml	Trübung, nicht löslich im Überschuß von Trichloressigsäure
6 mg/ml H_2O	Trifluoressigsäure (99 %) 2 Tropfen	T r ü b u n g
6 mg/ml H_2O	Ammoniumsulfat, gesättigte Lösung 1 ml	keine Trübung, nach Zugabe von etwa 10 mg festem Ammoniumsulfat erfolgte Trübung, die nach Verdünnung mit 5 ml H_2O verschwindet
6 mg/ml H_2O	Phosphomolybdänsäure 10 mg	gelblich-grüne Trübung

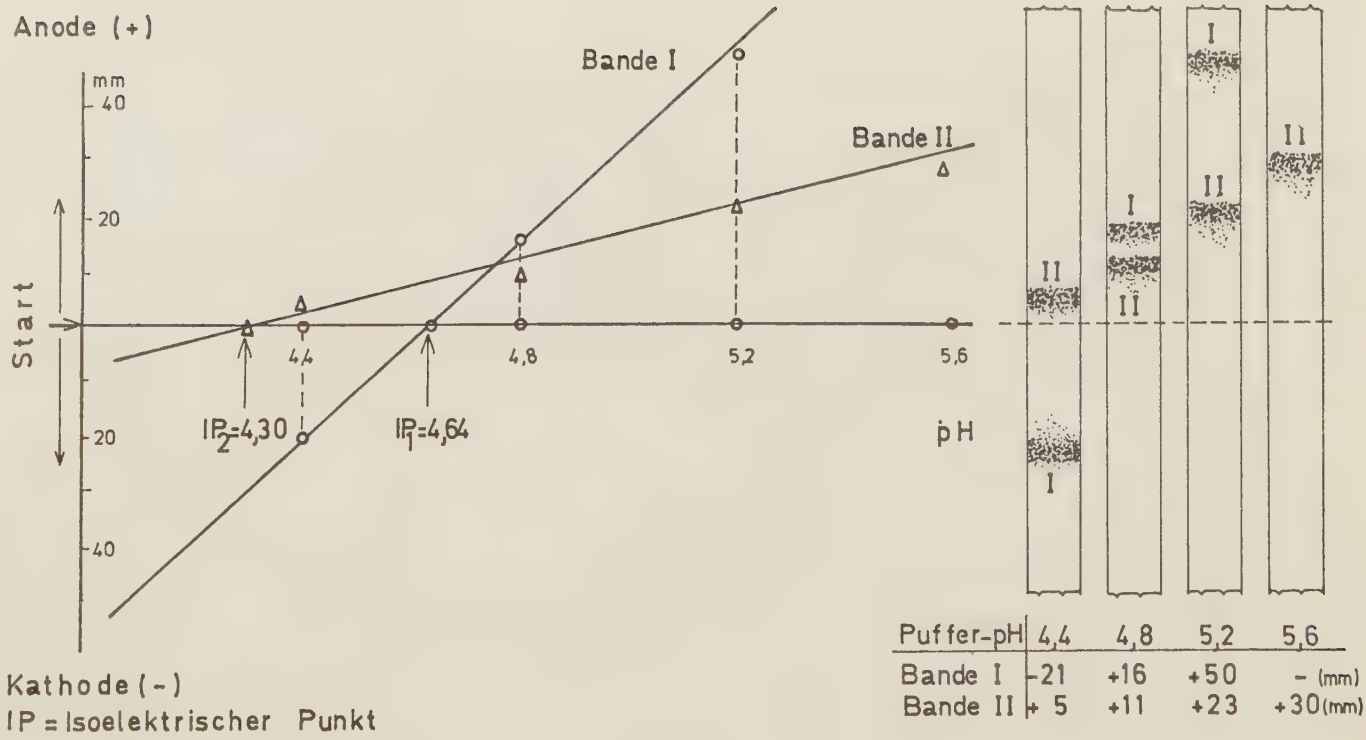


Abb. 12: Elektrophoretische Trennung des Serummukoid-Präparates auf Acetatfolie bei verschiedenen Puffer-pH. Laufzeit 60 min.

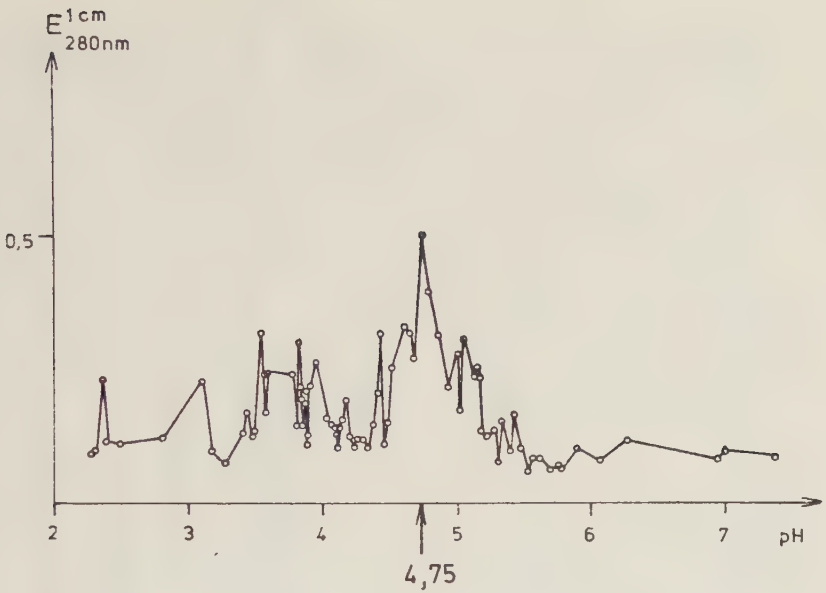


Abb. 13: Elektrofokussierung des Serummukoids

tät des Originalserums und seiner Gesamtlipide sowie des Extraktionsrückstandes verglichen. Abb. 14 zeigt das Ergebnis. Es besagt, daß vom Originalserum 4 µl genügen, um unter den gewählten Versuchsbedingungen eine 50 %ige Hämolyse der Testerythrozyten zu bewirken. Von dem aus demselben Serum extrahierten Gesamtlipid muß eine 15,6 µl Serum entsprechende Menge genommen werden, um unter gleichen Bedingungen eine 50 %ige Hämolyse von Testerythrozyten zu bewirken. Vom Extraktionsrückstand genügt eine 6,4 µl Serum entsprechende Menge hierzu. Wenn man die J-Aktivität des J^{cs}-Serums gleich 100 % setzt, so beträgt die Aktivität in ihrem Gesamtlipid 25,6 % und die im

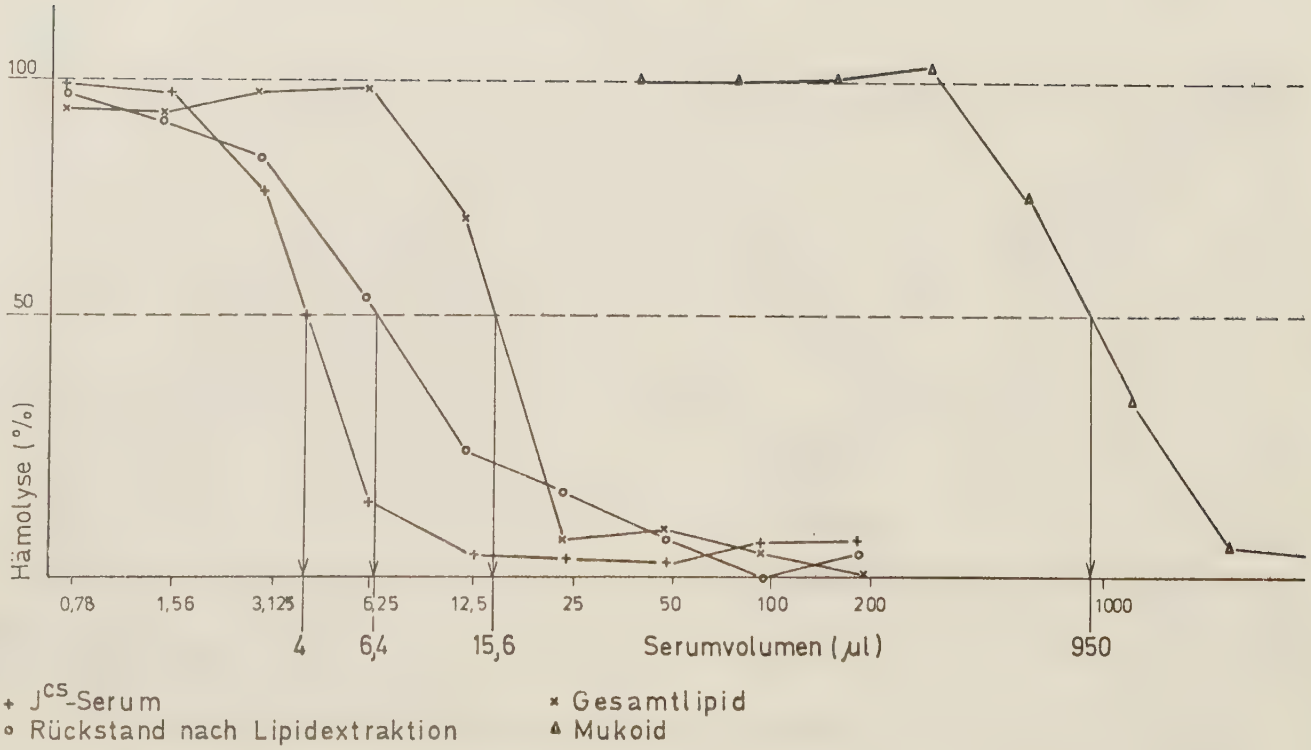


Abb. 14: Bestimmung der J-Aktivität von J^{cs}-Serum, seiner Gesamtlipide, des Extraktionsrückstandes und seiner Mukoide. Angegeben ist das Ausmaß der Hämolyse (%) von J^{cs}- Testerythrozyten als Funktion des Serumvolumens (µl), von welchen die bezeichneten Proben stammen. Alle Proben stammen von demselben Tier (Tier Nr. 1)

Extraktionsrückstand 62,5 %. Die Summe dieser beiden Prozentsätze sollte 100 % ergeben, macht tatsächlich aber nur 88,1 % aus. Bei der Schwierigkeit der quantitativen J-Aktivitätsbestimmung und den zahlreichen hiermit verbundenen Fehlermöglichkeiten ist dieses Ergebnis aber als durchaus befriedigend zu betrachten. Wird die J-Aktivität des aus demselben Serum extrahierten Mukoid-Präparates ebenfalls auf das Serumvolumen bezogen, so ergibt sich lediglich eine Aktivität von 0,4 %. Diese Werte sind in der nachstehenden Tab. 14 zusammengestellt.

Tab. 14: J-Aktivität im J^{cs}-Serum und seinen Fraktionen (Rind Nr. 1 vgl. Abb. 10)

	J - A k t i v i t ä t	
	50 % Hämolyse durch µl	bezogen auf J^{cs}-Serum %
J^{cs}-Serum	4,0	100
Gesamtlipid	15,8	25,6
Extraktionsrückstand	8,4	62,5
Mukoid	950	0,4

Da Mukoide auf Grund von Literaturhinweisen (MÜLLER, 1968) Molekulargewichte besitzen, die sie nach Gelfiltration im Bereich der L-Fraktion vermuten lassen, diese Fraktion aber (Abb. 8) serologisch inaktiv war,

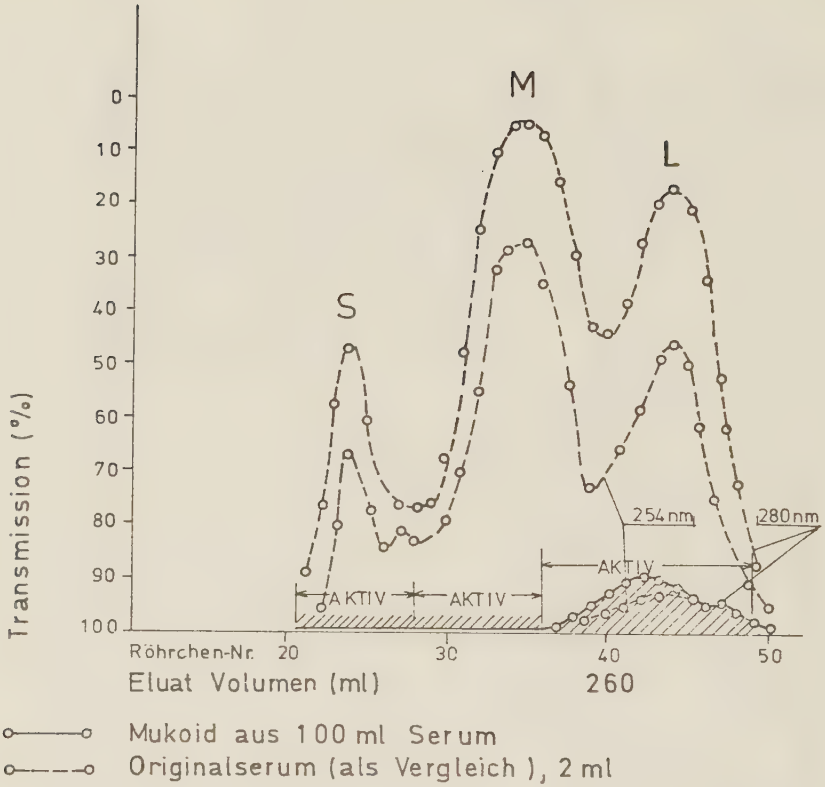


Abb. 15: Gelfiltration von J^{cs}-Serummukoid des Rindes mit Sephadex G-200.

wurde aus J^{cs}-Serum gewonnenes Mukoid selbst der Gelfiltration unterworfen. Man erhielt (Abb. 15) einen Gipfel im Bereich der L-Fraktion, die jetzt J-Aktivität aufwies. Obwohl im Bereich der S- und M-Fraktion keine photometrisch meßbare Substanz erschien, zeigten die Substanzspuren in diesen Bereichen doch auch eine geringe, aber deutliche J-Aktivität. Dieses Ergebnis beweist einerseits, daß die an das Mukoid gebundene J-Aktivität sehr gering ist, so daß sie in der L-Frak-

tion nach Gelfiltration von 2 ml Serum (Abb. 8) nicht nachgewiesen werden konnte, andererseits, daß das Mukoid-Präparat unmeßbar geringe Beimengungen aus der S- und M-Fraktion enthält, die an ihrer J-Aktivität erkannt werden können.

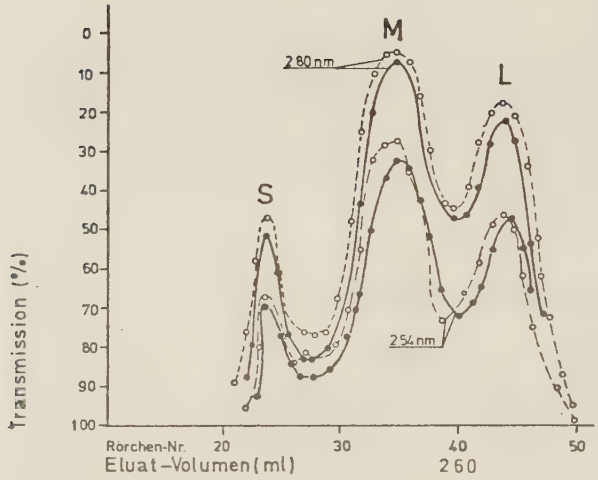
3.4. Fraktionierung mit Polyanionen

Die Behandlung des Blutserums mit Dextransulfat in Gegenwart von Calcium-Ionen liefert zwei Fraktionen: Präzipitierte und nichtpräzipitierte Stoffe. Auf Grund von Erfahrungen am menschlichen Blutserum (BURSTEIN et al., 1957) enthält das Präzipitat vorwiegend β-Lipoproteine, während sich im nicht-präzipitierten Überstand alle anderen Stoffe des Blutserums befinden, darunter auch die α-Lipoproteine. Der Einfachkeit halber sind diese beiden Fraktionen daher im folgenden als "β"-Lipoproteine bzw. "α"-Lipoproteine bezeichnet.

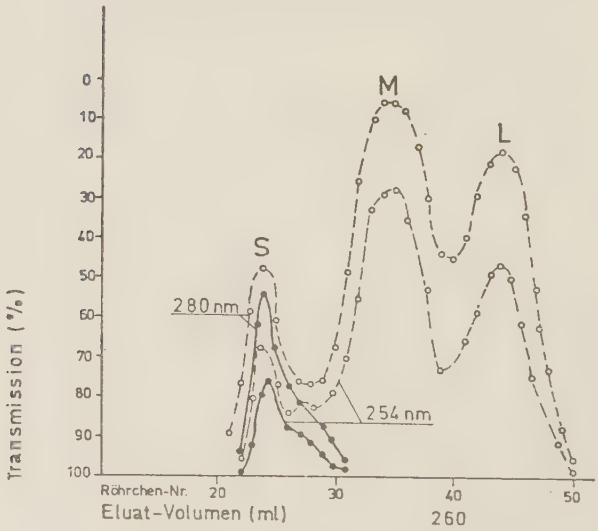
Tab. 15: Fraktionierung von J^{cs}-Serum des Rindes mit Dextransulfat. Zusammensetzung der Lipoproteine.

J^{cs}-Serum	Tier	Gesamtprotein mg/100 ml	Gesamtlipid mg/100ml	Summe mg/100 ml
	Rind			
	Nr. 1	6050,0	320,4	6370,4
	Nr. 6	6538,5	470,3	7008,3
"β"-Lipoprotein *	Nr. 1	568,0	220,2	788,2
	Nr. 6	585,0	315,2	900,2
"α"-Lipoprotein**	Nr. 1	5470,0	100,2	5570,2
	Nr. 2	5970,0	147,1	6117,1
Summe "α" + "β"	Nr. 1	6038,0	320,4	6358,4
	Nr. 6	6555,0	462,3	7017,3

* mit Dextransulfat fällbar ** nicht fällbar



α'-Lipoprotein aus 2ml Serum
Originalserum (als Vergleich), 2 ml



ß'-Lipoproteine aus 20ml Serum
Originalserum (als Vergleich), 2ml

Abb. 16: Gelfiltration von "α"-Lipoprotein (oben) und "β"-Lipoprotein (unten). Vergleich mit der Gelfiltration des Originalserums.

Nach Gelfiltration der "α"-Lipoproteine (Abb. 16) ergibt sich dementsprechend auch ein Fraktionierungstyp, der nicht wesentlich von dem des nativen Serums verschieden ist. Die "B"-Lipoproteinfraktion enthält jedoch, wie ebenfalls die Gelfiltration ergab (Abb. 16), vorwiegend Komponenten der S-Fraktion des Serums.

Eine Quantifizierung der Fraktionierung am Rinderserum erfolgte durch Bestimmung von Gesamtprotein und Gesamtlipiden sowohl im ursprünglichen Blutserum als auch in den beiden durch Dextransulfatfällung gewonnenen Fraktionen. Tab. 15 enthält die entsprechenden Daten, die sich auf zwei solcher Versuche beziehen. Die Tabelle zeigt, daß nach Fraktionierung und Summierung der entsprechenden Werte die ursprünglichen Gesamtprotein- und Gesamtlipidkonzentration sehr exakt wiedergefunden wird.

Zur Charakterisierung des Lipidanteils der beiden Fraktionen wurden chemische Analysen der aus ihnen extrahierten Lipide auf verschiedene Lipid-Klassen durchgeführt und mit entsprechenden Analysen am Gesamtlipid des ursprünglichen Serums verglichen (Tab. 16). Die Summierung der entsprechenden Werte stimmt auch hier überraschend gut mit den im ursprünglichen Serum ermittelten Werten überein. Weiterhin wurden die Lipoproteine im frisch gewonnenen Zustand durch die Aufzeichnung der UV-Spektren charakterisiert (Abb. 17).

Zur Charakterisierung des Proteinanteils der durch Dextransulfatfällung gewonnenen beiden Präparate ist die Elektrophorese am besten geeignet. Die Lipoprotein-Elektrophorese der "B"-Lipoproteine (Abb. 18) ergibt

Tab. 16: Ergebnisse der Lipid-Analysen von Rinderserum und von Lipoproteinen, präpariert durch Fällung mit Dextransulfat.

Tier	Probe	Cholesterin		Lipidzucker*	Lipidphosphor
		gesamt	frei		
		mg/100 ml Serum ± σ			
Rind Nr. 1	J^{cs}-Serum	116,4 ± 11,4	27,9 ± 3,1	1,24 ± 0,06	5,19 ± 0,06
Nr. 6		110,8 ± 10,4	16,8 ± 1,8	----------	----------
Nr. 1	"β"-Lipoprotein	87,8 ± 10,2	21,5 ± 0,9	0,33 ± 0,03	2,44 ± 0,04
Nr. 6		78,0 ± 9,5	10,0 ± 0,9	----------	----------
Nr. 1	"α"-Lipoprotein	27,6 ± 6,3	4,0 ± 0,2	0,91 ± 0,04	2,41 ± 0,02
Nr. 6		34,5 ± 5,5	6,0 ± 0,6	----------	----------
Nr. 1	Summe "α" + "β"	115,4	25,5	1,24	4,85
Nr. 6		112,5	16,0	----	----

* als Galaktose

2 durch Lipidfärbung sichtbare Banden, die beim Vergleich der durch Ultrazentrifugation gewonnenen Lipoproteine (siehe unten) sehr wahrscheinlich als VLDL und LDL anzusprechen sind; danach müßte die vorauslaufende Bande nach dem üblichen elektrophoretischen Klassifizierungsschema als prä-β-Lipoprotein und die nachfolgende kräftigere Bande als β-Lipoprotein zu bezeichnen sein. Dieses Ergebnis entspricht den Befunden am menschlichen Serum (BURSTEIN et al., 1970), wonach durch Dextran-

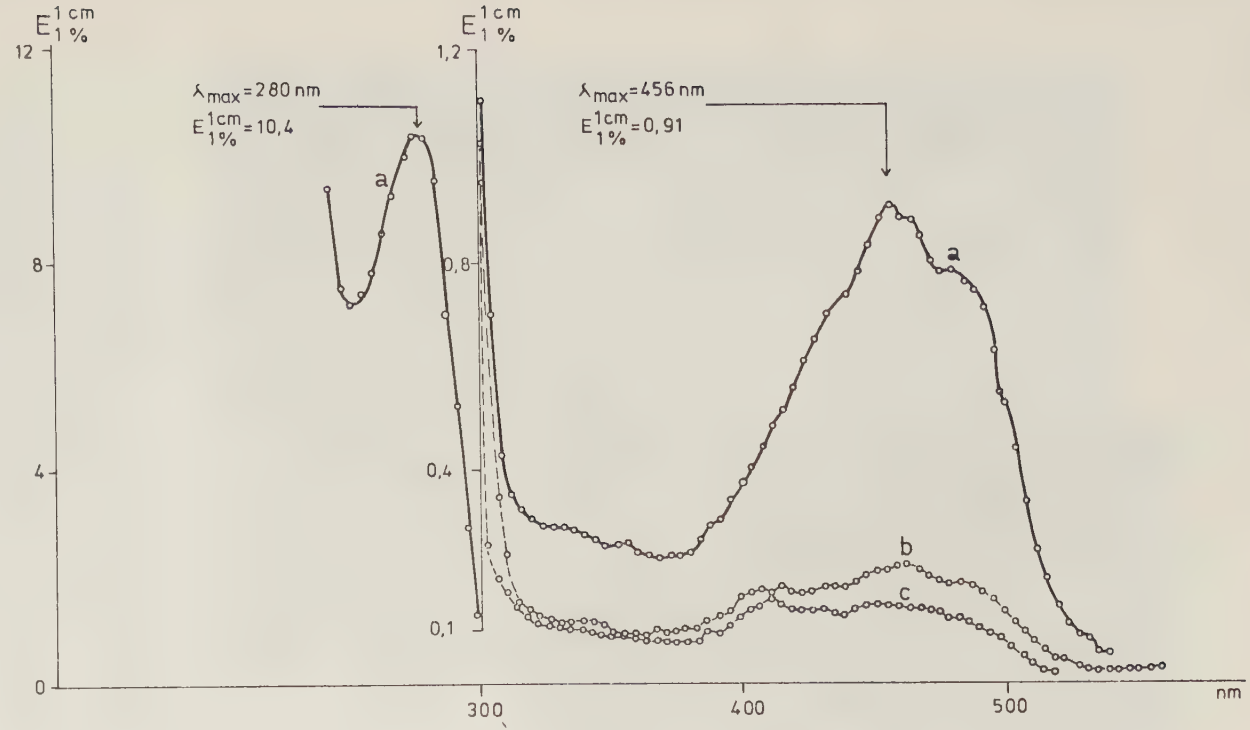


Abb. 17: UV-Spektren von "ß"- Lipoprotein (a), J^{cs}-Serum (b) und "α"-Lipoprotein (c). Die Extinktion ist auf eine Konzentration von 1 % Protein bezogen.

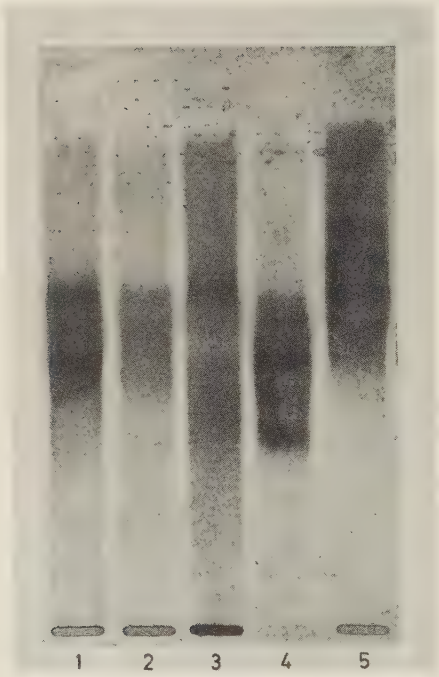


Abb. 18: Lipoprotein-Elektrophorese in Agarose-Gel bei pH 8,2.
Lipidfärbung mit Sudan Schwarz B.
1 = "β"-Lipoprotein nach Dextransulfat-Fällung
2 = VLDL
3 = VLDL-LDL-Gemisch
4 = LDL
5 = HDL
} präpariert durch Ultrazentrifugation

sulfatfällung nicht nur die LDL, sondern auch die VLDL erfaßt werden.

Eine elektrophoretische Analyse der "β"- und "α"-Lipoproteine in Polyacrlyamidgel, bei der die Lipoproteine

nicht wandern, sondern nur die lipidfreien Proteine, diente zur Reinheitskontrolle der Lipoprotein-Präparate. Abb. 19 zeigt, daß beide Fraktionen auch Fremd-

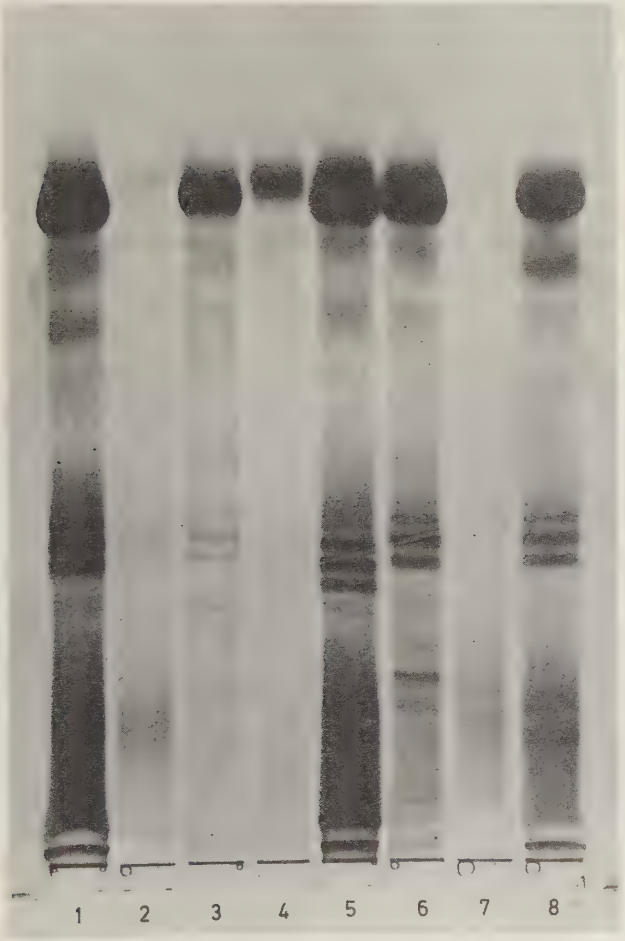


Abb. 19: Reinheitskontrolle der Lipoprotein-Präparate durch Polyacrylamid-Elektrophorese bei pH 8,9. Proteinfärbung mit Coomassie brillant blue R. 250.

1, 5, 8 = Serum (J^{CS}-Rind) 2 = LDL 3 = HDL 7 = VLDL
präpariert durch Ultrazentrifugation

6 = "α"-Lipoprotein 4 = "β"-Lipoprotein
präpariert durch Dextransulfatfällung

proteine enthalten. Für die "α"-Lipoproteine ist dies zu erwarten, da im Überstand nach Dextransulfatfällung alle Proteine des Serums außer den "β"-Lipoproteinen zugegen sein müssen; das Elektropherogramm (Abb. 19) läßt neben Albuminen Transferrine, Globuline und einige weitere Protein-Banden erkennen. Aber auch die "β"-Lipoproteinfraktion enthält noch Albumine. Dies entspricht ebenfalls den Erfahrungen am menschlichen Serum, wonach die Dextransulfatfällung kein reines LDL-Präparat ergibt, sondern nur geeignet ist, LDL von größeren Serumvolumina zwecks weiterer Reinigung durch Ultrazentrifugation zu konzentrieren (S. MARGOLIS, in: E. TRIA und A.M. SCANU, 1969). Auch die immunoelektrophoretische Untersuchung der "β"- und "α"-Lipoproteine im Vergleich zum Gesamtserum zeigt (Abb. 20) die starke Verunreinigung der durch Dextransulfatfällung gewonnenen Präparate mit Fremdproteinen. Die Immunoelektropherogramme zeigen jedoch, daß die "β"-Lipoprotein-Fraktion frei von α-Lipoproteinen und die "α"-Lipoprotein-Fraktion frei von β-Lipoproteinen ist.
Die ersten lipoprotein-elektrophoretischen Untersuchungen der durch Dextransulfatfällung gewonnen Fraktionen führten nicht zu deutbaren Ergebnissen. Es zeigte sich, daß dies auf das noch vorhandene Dextransulfat zurückzuführen war, das mit den β-Lipoproteinen Komplexe bildet, die wegen des Überschusses von negativen Ladungen zu völlig anderen elektrophoretischen Eigenschaften führten. Die oben skizzierten lipoprotein- und immunoelektrophoretischen Untersuchungen mußten daher an einer "β"-Lipoprotein-Fraktion durchgeführt werden, die von dem noch vorhandenen Dextransulfat völlig befreit war. Die Gegenwart von Dextransulfat wurde durch Metachromasie einer Toluidinblau-Lösung nachgewiesen. Das Spektrum einer reinen Toluidinblau-Lösung (Abb. 21) weist

ein Absorptionsmaximum bei 630 nm und eine Schulter bei 590 nm auf. Durch Zusatz steigender Mengen von Dextransulfat wird dieses Absorptionsmaximum immer mehr abgeflacht, während allmählich ein Nebenmaximum bei einer kürzeren Wellenlänge entsteht. Vergleicht man mit dieser Kurvenschar (Abb. 21) das Spektrum einer "β"-Lipoproteinlösung, die noch Dextransulfat enthält, so ist deren Dextransulfatgehalt durch Ein-

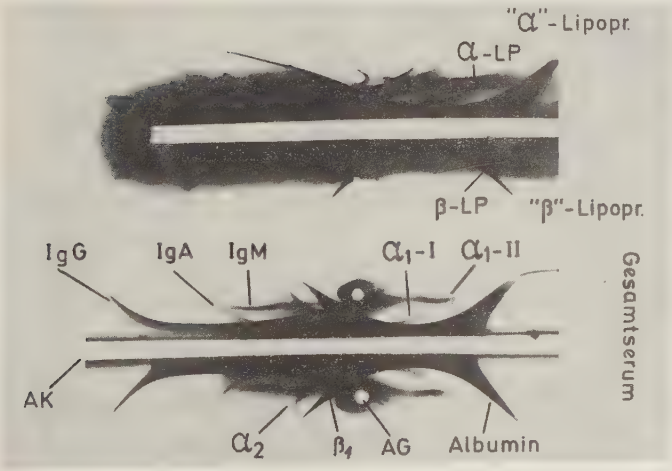
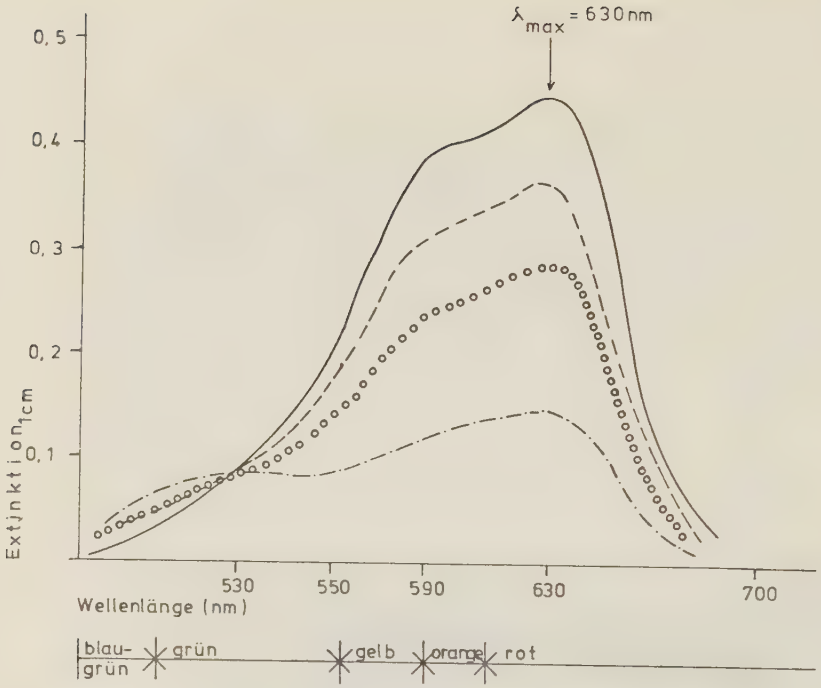


Abb. 20: Immunoelektrophoretische Untersuchung von "α"- und "β"-Lipoproteinen, präpariert durch Dextransulfatfällung, sowie von Gesamtserum (zum Vergleich). Proteinfärbung durch Amidoschwarz 10 B.
AG = Antigen-Behälter
AK = Antikörper-Gaben.



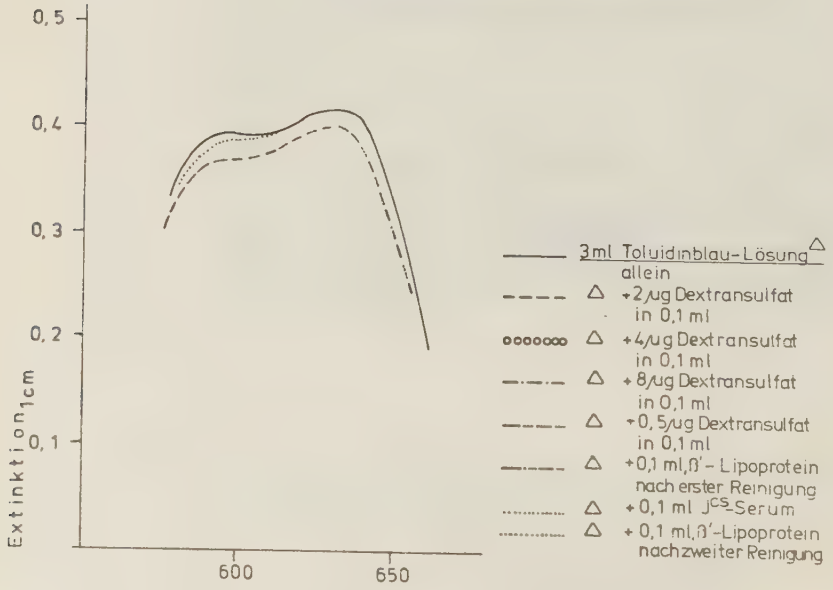


Abb. 21: Spektralphotometrischer Nachweis von Dextransulfat durch Metachromasie. Oben: Spektrum von Toluidinblau-Lösung ohne und mit Dextransulfat. Unten: Nachweis der erfolgten Reinigung von "β"-Lipoprotein.

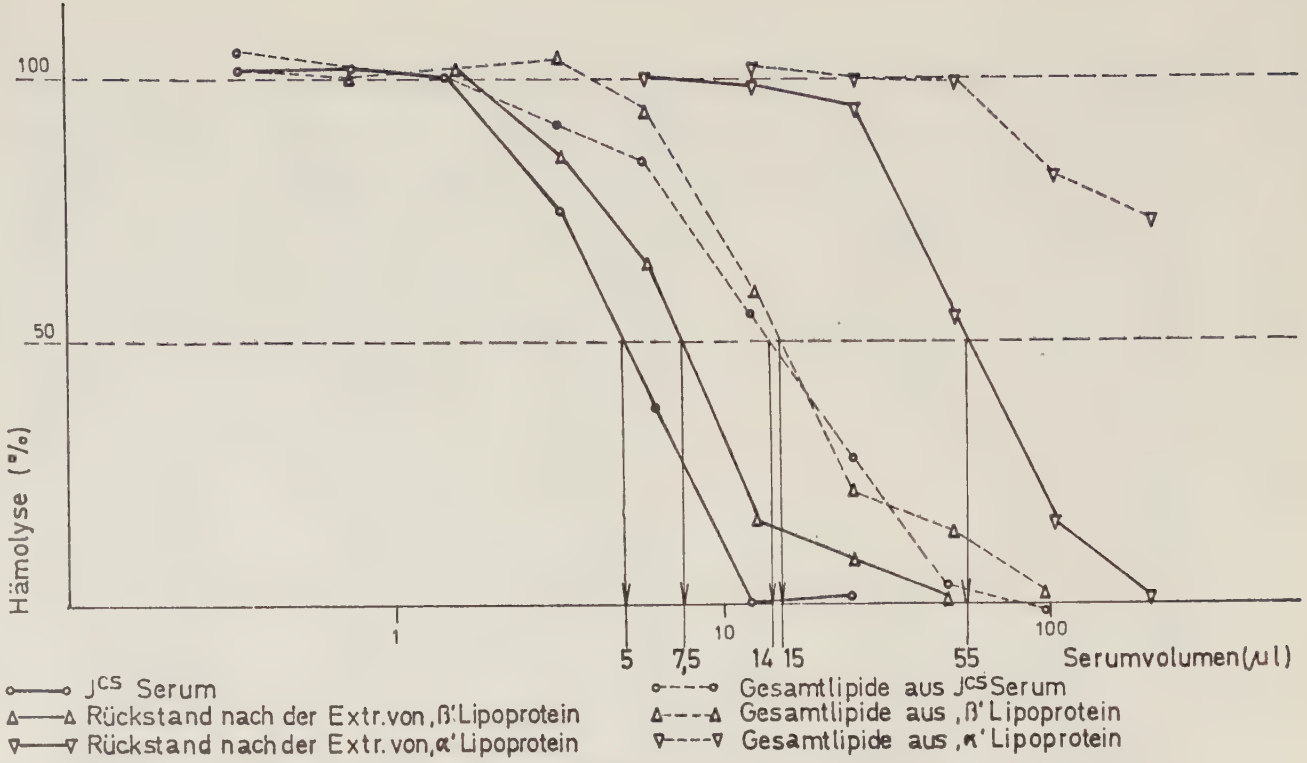


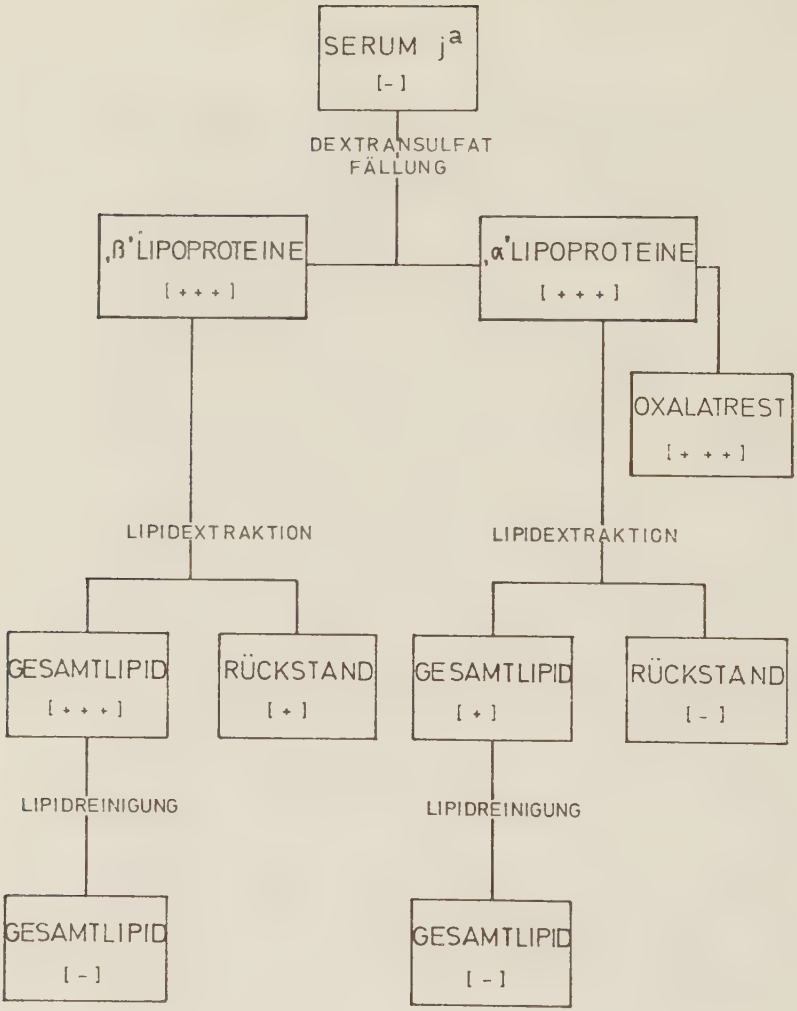
Abb. 22: Bestimmung der J-Aktivität von J^{cs}-Serum und der Fraktionen nach Dextransulfat-Fällung. Angegeben ist das Ausmaß der Hämolyse (%) von J^{cs}-Testerythrozyten als Funktion des Serumvolumens (µl), von welchen die bezeichneten Proben stammen.

gabeln (Interpolieren) bestimmbar. Dextransulfat kann durch die im methodischen Teil (S. 20) beschriebene Methode entfernt werden. Der Erfolg dieser Prozedur ist ebenfalls in Abb. 21 dargestellt. Die Zugabe von 0,1 ml gereinigter "β"-Lipoprotein-Lösung zu 3 ml Toluidinblau-Lösung zeigt eine geringfügige Depression des Kurvenverlaufes, die jedoch auf die mit dem Zusatz von 0,1 ml der Lipoprotein-Lösung erfolgenden Verdünnung zurückzuführen ist, wie der Vergleich mit dem Spektrum nach Verdünnung der Toluidinblau-Lösung durch Zusatz von 0,1 ml Wasser oder 0,1 ml Serum zeigt (Abb. 21).

Die somit hinreichend charakterisierten Fraktionen, die durch Dextransulfat-Fällung aus J^{cs}-Serum gewonnen worden waren, wurden nun auf ihre J-Aktivität untersucht und mit der des ursprünglichen Serums verglichen. Dabei wurde auch die Verteilung der J-Aktivität auf die Gesamtlipide und Extraktionsrückstände der "α"- und "β"-Lipoproteine untersucht. Dieser gesamte Bestimmungszyklus wurde zunächst an 3 verschiedenen J^{cs}-Seren durchgeführt. Das Ergebnis eines dieser Bestimmungszyklen ist in Form der Hämolysekurven in Abb. 22 dargestellt. Alle 3 Bestimmungen ergaben vorwiegend J-Aktivität in den aus den "β"-Lipoproteinen extrahierten Lipiden und im Extraktionsrückstand, während die Lipide der "α"-Lipoproteine nicht oder kaum J-aktiv waren und der Extraktionsrückstand aus den "α"-Lipoproteinen wieder höhere J-Aktivitäten zeigte. Setzt man die J-Aktivität im nativen J^{cs}-Serum 100 %, so ergab die Summe der J-Aktivitäten der erwähnten Endfraktionen 107 %. Durch Zufall fand sich, daß das zur Fällung der "β"-Lipoproteine benutzte Dextransulfat selbst eine J-Aktivität vortäuscht. Dies mag darauf zurückzuführen sein, daß das Dextransulfat-

Präparat, dem ein aus Glucoseeinheiten aufgebautes Polysaccharid zugrunde liegt, Verunreinigungen enthält, die einer der J-Substanz ähnliche oder sogar gleiche terminale Zuckersequenz aufweisen. Durch diese Feststellung sind die eben erwähnten Befunde fragwürdig geworden. Aus diesem Grunde wurde der Einfluß des Dextransulfates auf den J-Aktivitätsnachweis in den verschiedenen Fraktionen durch Verwendung von j^a-Serum geprüft. Das Ergebnis zeigt Abb. 23. Das j^a-Serum zeigt selbstverständlich keine J-Aktivität, jedoch sind die beiden durch Dextransulfat-Fällung gewonnenen Fraktionen stark aktiv. Nach der Extraktion der Lipide aus den jeweiligen Lipoprotein-Fraktionen weist der Extraktionsrückstand der "β"-Lipoproteine eine geringe Aktivität auf, während der Rückstand der "α"-Lipoproteine keine Aktivität zeigt; in letzterem Falle ist die Aktivität mit der Oxalatfällung offensichtlich ganz beseitigt worden. Der Lipidanteil der beiden Lipoproteinfraktionen weist eine starke bzw. geringe Aktivität auf, die aber nach Lipidreinigung an einer Sephadexsäule, die in allen Fällen routinemäßig durchgeführt worden war, vollständig verschwand. Die schwache Reaktion, die im Extraktionsrückstand festzustellen ist, ist möglicherweise die Ursache für eine etwas zu hohe J-Aktivität in den Rückständen aus den Lipoprotein-Fraktionen von J^{cs}-Serum; hierauf ist wahrscheinlich die über 100 % liegende Summe der J-Aktivitäten zurückzuführen.

Aus diesem Grunde wurde die J-Aktivitätsbestimmung in den Fraktionen einer neuen Probe von J^{cs}-Serum wiederholt, wobei jedoch die "β"-Lipoproteinfraktion vorher von überschüssigem Dextransulfat mit Hilfe von Protaminsulfat befreit wurde. Das Ergebnis ist in Form von Hämolysekurven in Abb. 24 und als schematische Aufstellung in Abb. 25 aufgeführt. Hieraus geht zu-



Aktivität:
[-] nicht aktiv
[+] schwach aktiv
[++] aktiv
[+++] stark aktiv

Abb. 23: Pseudo-J-Aktivität durch Dextransulfat. Nachweis der Verteilung der Aktivität nach Dextransulfatfällung.

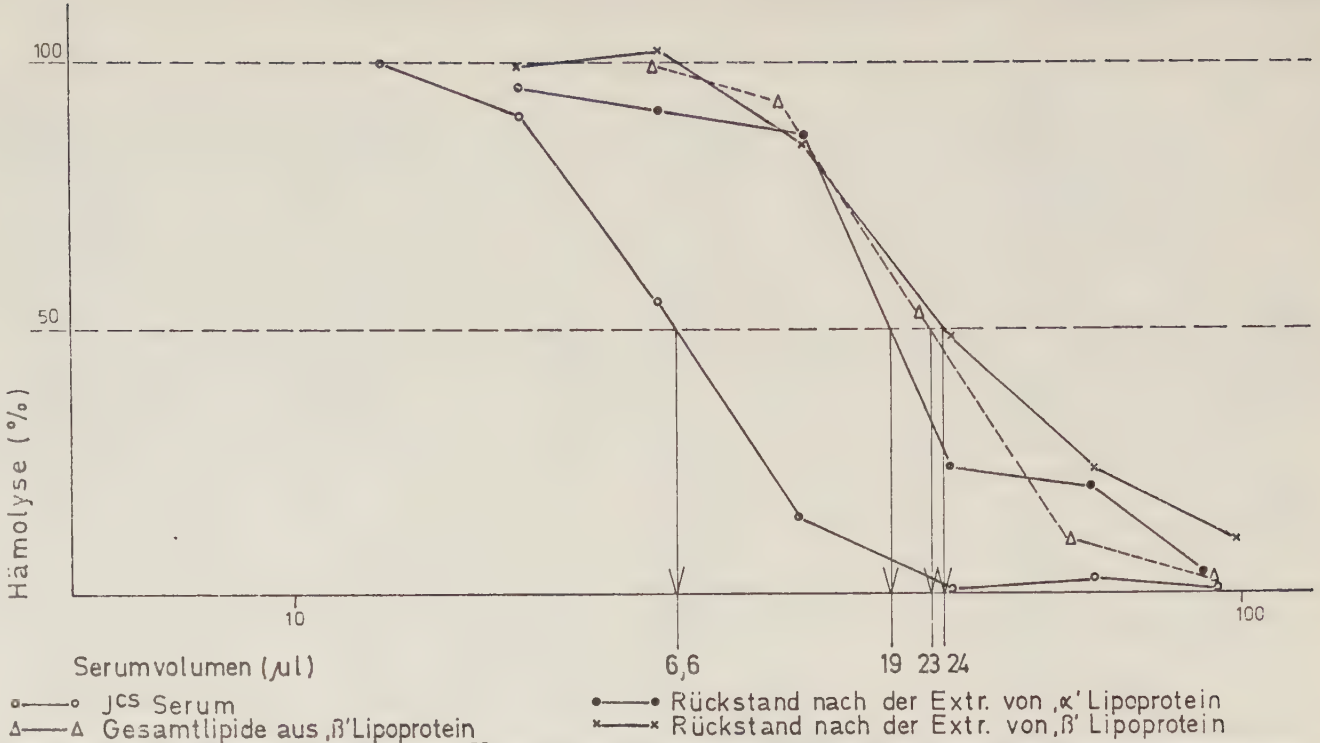


Abb. 24: Bestimmung der J-Aktivität von J^{cs}-Serum aus den Fraktionen nach Dextransulfatfällung sowie nach Entfernung der Dextransulfatreste aus "ß"-Lipoproteinen. Angegeben ist das Ausmaß der Hämolyse (%) von J^{cs}-Test-erythrozyten als Funktion des Serumvolumens (µl), von welchen die bezeichneten Proben stammen.

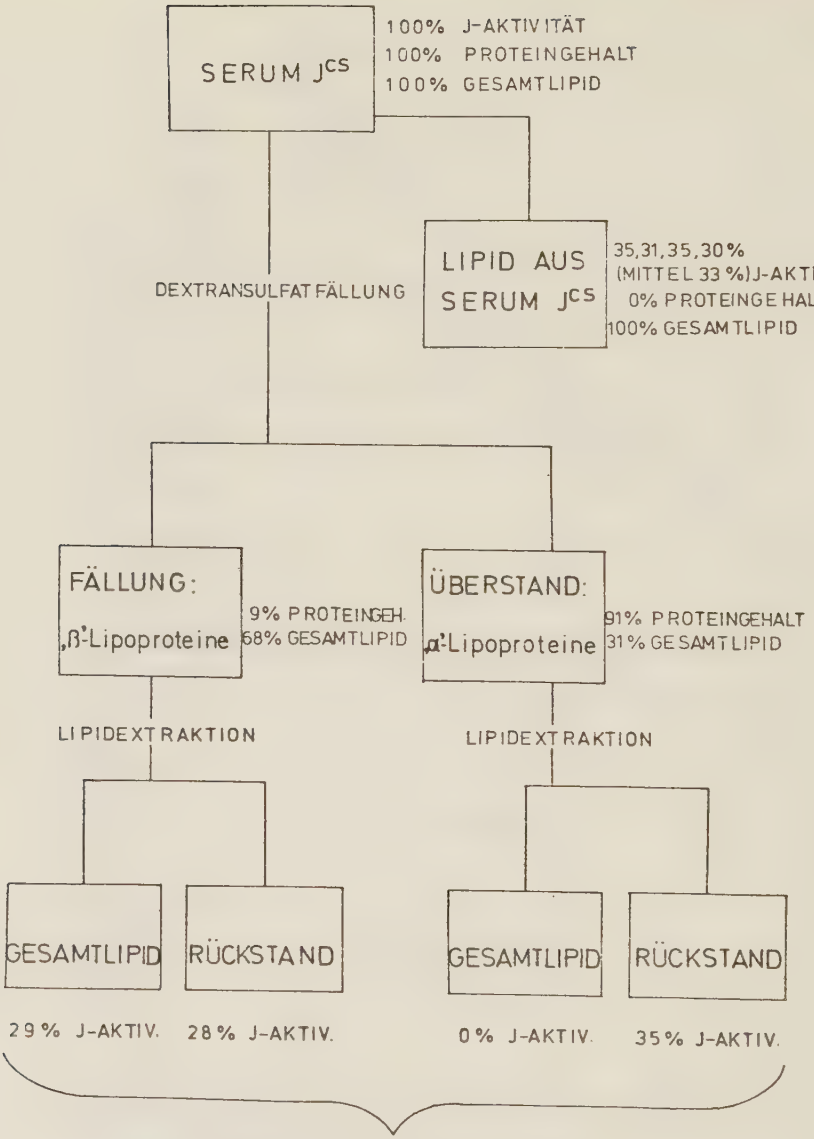


Abb. 25: Verteilung der J-Aktivität auf verschiedene durch Dextransulfat gewonnene Fraktionen aus J^{CS}-Serum. Die "β"-Lipoproteine wurden mit Protaminsulfat von Dextransulfatresten befreit. Die Aktivitätsangaben beim Lipid aus Gesamtserum beziehen sich auf 4 verschiedene Serumproben.

nächst die schon bekannte Tatsache hervor, daß 1/3 der gesamten J-Aktivität des J^{cs}-Serums im Gesamtlipidextrakt zu finden ist. Durch Dextransulfatfällung erhält man 9 % der Proteine des Gesamtserums in der Fraktion der "β"-Lipoproteine und 91 % in der der "α"-Lipoproteine. Diese Relation ist auch aus Tab. 15 zu entnehmen. Die im Gesamtlipid des Serums nachgewiesene J-Aktivität findet sich praktisch vollständig im Lipidanteil der "β"-Lipoproteine.

Aus den analytischen Daten (Tab. 15 und 16, Abb. 16-20 geht hervor, daß die Dextransulfat-Fällung zur Anreicherung der β-Lipoproteine für Rinderserum ebenso geeignet ist wie für menschliches Serum. Zur Fällung und Bestimmung der β-Lipoproteine im menschlichen Serum ist eine Test-Kombination im Handel (Boehringer Nr. 15945), die es erlaubt, diese Bestimmung auf einfache Weise und mit minimalen Serumvolumina (0,05 ml) routinemäßig durchzuführen. Als Fällungsmittel dient hier jedoch nicht Dextransulfat mit $CaCl_2$, sondern Heparin mit $CaCl_2$. Die Fällung wird abzentrifugiert und das Sediment zu einer Cholesterinbestimmung benutzt. Da menschliche β-Lipoproteine ca. 35 % Cholesterin enthalten, läßt sich die ungefähre Konzentration der β-Lipoproteine im menschlichen Serum errechnen. Die erwähnte Test-Kombination wurde auch auf Rinderserum angewendet, wofür 20 Proben von Schlachthofblut zur Verfügung standen. Dabei fand sich (Tab. 17) überraschenderweise ein sehr niedriger Cholesteringehalt in der Fällung (im Mittel 15,84 mg/100 ml).

In den oben beschriebenen Versuchen zur Fällung der "β"-Lipoproteine mit Dextransulfat wurden jedoch ca. 80-90 mg/100 ml Serum gefunden, d.h. ca. 70-75 % des Gesamtcholesterins des Serums. Diese Diskrepanz zwischen dem Cholesteringehalt in der Fällung der "β"-

Tab. 17: Gesamt- und freies Cholesterin und Cholesterin aus "B"-Lipoprotein von 20 Rinderseren (Schlachthofblut). Jede Bestimmung wurde doppelt durchgeführt. Die B-Lipoproteinbestimmung (Boehringer-Test-Combination Nr. 15 945) beruht auf der Fällung der "B"-Lipoproteine mit Heparin.

Tier-Nr.	Gesamt-Cholesterin (nach COURCHAINE et al., 1959)	freies Cholesterin	B-Lipoprotein-Cholesterin
	mg/100 ml	mg/100 ml	mg/100 ml
15	43,0	6,0	2,17
16	44,0	6,5	2,17
17	121,0	18,0	17,90
18	126,5	23,5	12,00
19	143,0	23,0	34,80
20	121,0	19,0	45,60
21	124,0	13,0	43,50
22	150,5	22,5	14,10
23	89,0	14,5	13,00
24	181,5	23,0	34,80
25	75,5	12,2	6,69
26	53,5	7,0	4,63
27	177,0	35,5	8,24
28	94,5	17,0	7,72
29	142,0	25,7	12,88
30	122,5	21,5	7,21
31	152,5	31,2	15,46
32	192,0	33,0	12,36
33	124,0	24,0	11,34
34	131,5	25,7	12,37
Mittel ±σ	120,4 ± 43,7	20,0 ± 7,78	15,84 ± 13,05

Lipoproteine aus Rinderserum mit Hilfe von Heparin und dem in der Fällung mit Hilfe von Dextransulfat könnte jedoch darauf zurückzuführen sein, daß die 20 untersuchten Rinderseren zufälligerweise sehr niedrige Cholesterinspiegel hatten. Daher wurden auch die Gesamtcholesterinspiegel derselben Proben untersucht, wobei, wie Tab. 17 zeigt, zwar starke Streuungen, im Mittel jedoch ein viel höherer Gesamtcholesteringehalt (120,4 mg/100 ml) gefunden wurde. Aus diesen Versuchsergebnissen ist zu schließen, daß Heparin zur quantitativen Fällung der β-Lipoproteine aus Rinderserum nicht brauchbar ist, während Dextransulfat ebenso gut angewendet werden kann wie für die Fällung von β-Lipoproteinen aus menschlichem Serum. Worauf diese Verschiedenartigkeit beruht, kann aus den hier durchgeführten Untersuchungen nicht geschlossen werden.

3.5. Fraktionierung durch Ultrazentrifugation

Die durch Fällung mit Dextransulfat erhaltenen Ergebnisse wurden mit Ergebnissen, die durch Fraktionierung der Lipoproteine des J^{cs}-Rinderserums mit Hilfe der Ultrazentrifuge gewonnen worden waren, verglichen; hierbei ergab sich die Möglichkeit, insgesamt drei Lipoproteinfraktionen zu erhalten, nämlich die Fraktion VLDL, LDL und HDL.

Die Ergebnisse der chemisch-analytischen Charakterisierung der durch Ultrazentrifugation erhaltenen Lipoproteine sind in den Tabellen 18-20 zusammengefaßt. Tab. 18 zeigt, daß nur etwa 2,4 % der gesamten Serumproteine in den 3 Lipoproteinfraktionen vorliegen.

Tab. 18: Fraktionierung von J^{cs}-Rinderserum* durch Ultrazentrifugation. Zusammensetzung der Lipoproteine. Vergleich mit dem Ergebnis der Dextransulfatfällung. n = 3.

Probe	Gesamtprotein	Gesamtlipid	Lipoprotein (ber.)	Lipoprotein (gef.)
	mg/100 ml S e r u m			
J^{cs}-Serum	7313,C ± 160,5	393,0	--------	--------
VLDL	7,2 ± 1,5	58,8	66,0	67,8
LDL	37,7 ± 1,7	117,9	155,6	158,0
HDL	130,4 ± 8,3	166,1	296,5	322,3
Summe (VLDL + LDL + HDL	175,3	342,8	518,1	548,1
F Ä L L U N G MIT D E X T R A N S U L F A T				
"β"-Lipoprotein	683,7 ± 25,9	198,7	882,4	------
"α"-Lipoprotein	6597,1 ±183,2	150,3	-------	------

ber. = Summe von Gesamtprotein und Gesamtlipid

gef. = Ergebnis der Bestimmung der Trockenmasse

*Rind Nr. 7

Tab. 18: Ergebnisse der Lipid-Analysen von Lipoproteinen nach Ultrazentrifugation von J^{CS}-Serum.* Vergleich mit "β"-lipoproteinen nach Dextransulfatfällung.

Probe	Cholesterin		Phosphor
	gesamt	frei	
	mg / 100 ml Serum ± σ		
J^{CS}-Serum	121,9 ± 4,59	21,0 ± 1,00	5,34 ± 0,034
VLDL	13,3 ± 0,99	3,35 ± 0,08	0,67 ± 0,034
LDL	48,3 ± 3,74	5,20 ± 0,60	1,24 ± 0,056
HDL	39,6 ± 6,15	6,65 ± 0,50	2,09 ± 0,170
Summe VLDL+LDL +HDL	101,4	15,20	4,0
"β"-Lipoprotein	70,3 ± 2,8	13,4 ± 0,70	1,56 ± 0,250

*Rind J^{CS}-Nr. 7

Durch Dextransulfatfällung wurden dagegen Lipoproteinfraktionen erhalten, die auch lipidfreie Proteine enthalten; speziell trifft dies für "α"-Lipoproteine zu. Werden die Gesamtlipidgehalte aller durch Ultrazentrifugation erhaltenen Lipoproteinfraktionen summiert, so erhält man ein Defizit von 13 %, was ebenfalls aus Tab. 18 hervorgeht. Dieses Defizit ist durch die Art der Auf-

arbeitung zu erklären; denn geringe Materialverluste lassen sich bei der Gewinnung der einzelnen Fraktionen aus den Zentrifugenröhrchen nicht vermeiden.

Durch die Ultrazentrifugation wurde J^{cs}-Serum in 4 Fraktionen zerlegt, nämlich in VLDL, LDL, HDL und den nach Entfernung aller Lipoproteine verbleibenden Rest. Die aus diesen Fraktionen extrahierten Lipide und die entsprechenden Extraktionsrückstände wurden quantitativ auf J-Aktivität untersucht und verglichen mit der J-Aktivität des ursprünglichen J^{cs}-Serums und der daraus extrahierten Gesamtlipide. Aus dem Serumrest, der nach Entfernung der Lipoproteine übrigblieb, konnte erwartungsgemäß kein Lipid mehr extrahiert werden. Die Ergebnisse der J-Aktivitäts-Bestimmung, soweit sie meßbare Werte ergaben, sind in Form der Hämolyse-Kurven in Abb. 26 aufgeführt, alle Resultate der Aktivitätsbestimmungen sind in einer Übersicht in Abb. 27 zusammengestellt. In dieser Abbildung sind auch die Ergebnisse der J-Aktivitätsbestimmung nach Dextransulfatfällung desselben Serums wiedergegeben. Schließlich wurde der stark J-aktive Serumrest, der nach Ultrazentrifugation zurückblieb (B_2 in Abb. 5), mit Perjodat behandelt. Daraufhin verschwand die J-Aktivität vollständig.

Tab. 20: Anteil der Proteine und Lipide in der durch Ultrazentrifugation getrennten Lipoproteinfraktionen. Werte errechnet aus den Tabellen 18 und 19.

Fraktion	Proteine	Gesamtlipide	Cholesterin		Phosphatid**
			gesamt	frei	
	%	%	%	%	%
Werte bezogen auf die entsprechende Lipoprotein-Fraktion*					
VLDL	10,9	89,1	20,4	5,1	25,4
LDL	24,2	75,8	31,0	3,3	19,9
HDL	44,0	56,0	13,4	2,2	17,6
"B"-Lipoprotein (zum Vergleich)	77,5	22,5	8,0	1,5	4,4
Werte bezogen auf die entsprechende Lipidfraktion des Gesamtserums					
VLDL	--	14,8	11,1	16,0	12,5
LDL	--	29,8	39,6	24,8	23,2
HDL	--	42,0	32,5	31,7	39,1
"B"-Lipoprotein (zum Vergleich)	--	50,3	57,7	63,8	29,2

* der wahrscheinlich in geringen Mengen vorhandene Kohlenhydratanteil wurde nicht berücksichtigt.

** berechnet aus % Lipid-Phosphor x 25

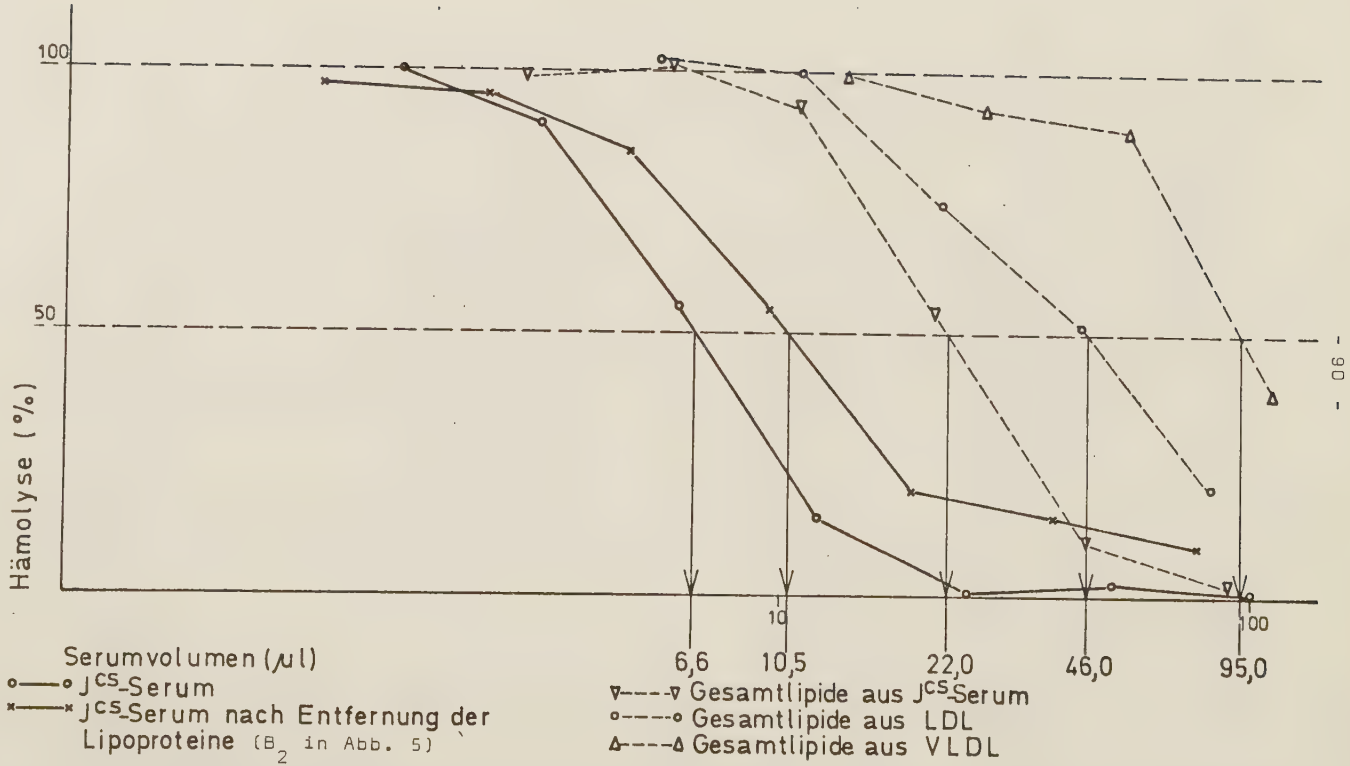


Abb. 26: Bestimmung der J-Aktivität von J^{CS}-Serum und der durch Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktion. Angegeben ist das Ausmaß der Hämolyse (%) von J^{CS}-Testerythrozyten als Funktion des Serumvolumens (µl), von welchen die bezeichneten Proben stammen.

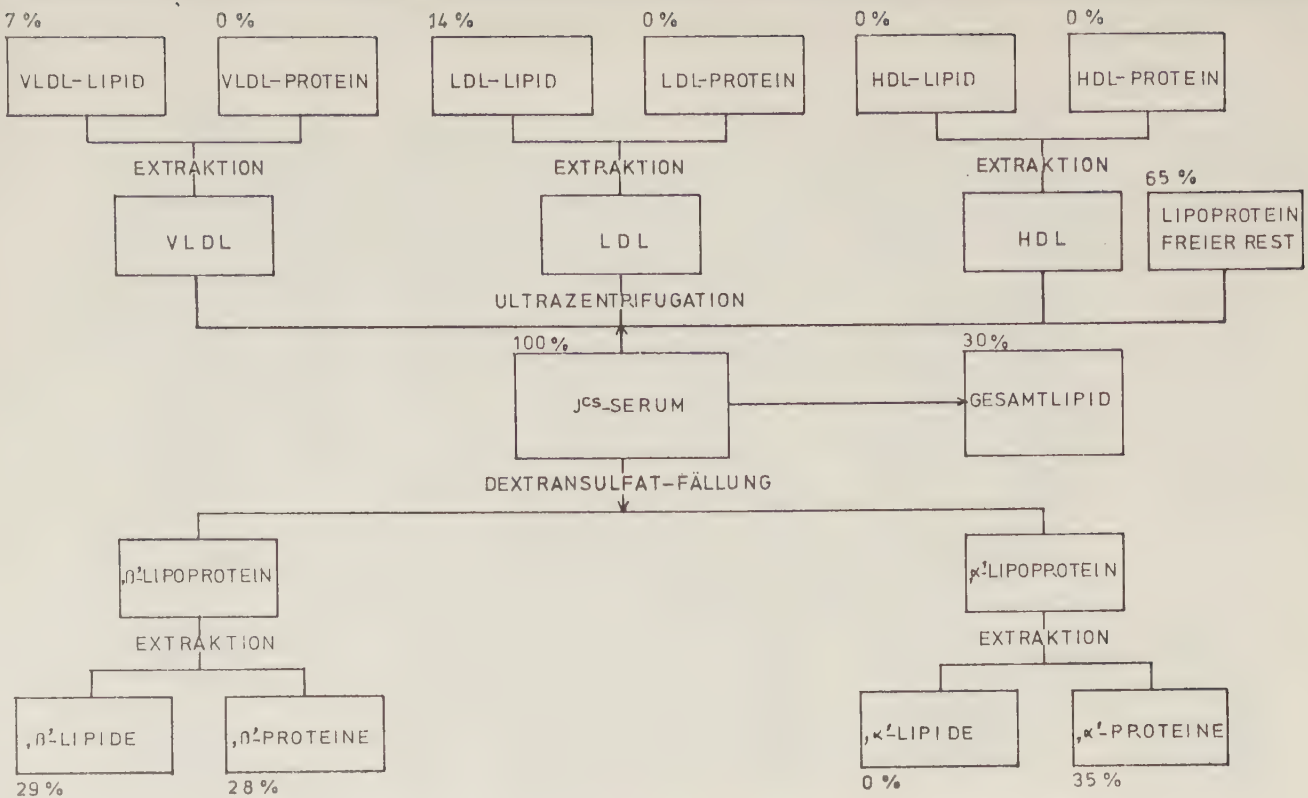


Abb. 27: Die J-Aktivität der Rinderserumfraktion nach Ultrazentrifugationen und Dextransulfatfällung (Übersicht).

4. DISKUSSION

4.1. J-Aktivität

Aus früheren Untersuchungen der Göttinger Arbeitsgruppe war bekannt (SCHRÖFFEL et al., 1971), daß die J-Aktivität im Serum von erwachsenen J^{cs}-Rindern zu etwa 1/3 in den Gesamtlipiden und zu etwa 2/3 in dem proteinhaltigen Extraktionsrückstand zu finden ist. Der Hauptzweck der vorliegenden Arbeit ist die genauere Analyse und Identifizierung dieser beiden für die J-Determinante fungierenden Trägermoleküle.

Die in dem vorangehenden Abschnitt beschriebenen Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die lipide J-Substanz zu 1/3 in der VLDL-Fraktion und zu 2/3 in der LDL-Fraktion transportiert wird, dagegen nicht in der HDL-Fraktion. Die nicht-lipide J-Substanz findet sich vollständig in dem lipoprotein-freien Rest des J^{cs}-Serums, und zwar wahrscheinlich in Form von Glykoproteinen, während der Proteinanteil der Lipoproteine völlig frei ist von J-Aktivität. Daß die nichtlipide J-Substanz wahrscheinlich in Form eines Glykoproteins vorliegt, läßt sich aus folgenden Tatsachen schließen: Alle zum J-Aktivitätsnachweis eingesetzten Proben von Extraktionsrückständen wurden dialysiert, enthalten also nur noch relativ hochmolekulare Bestandteile, d.h. Proteine. Nach Oxydation mit Perjodat verschwindet die J-Aktivität im lipidfreien Serumrest vollständig; da hierdurch die in Kohlenhydraten vorliegenden α-Diole gespalten werden, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß die kohlenhydratartige J-Determinante als prosthetische Gruppe von Glykoproteinen vorliegt.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Befunden, die an Fraktionen des J^{cs}-Serums erhalten wurden, welche durch Dextransulfatfällung und durch Gelfiltration gewonnen worden waren.

In der erwähnten früheren Arbeit (SCHRÖFFEL et al., 1971a) wurde bereits durch qualitative Untersuchungen eine J-Aktivität der aus J^{cs}-Serum isolierten Mukoide gefunden; da Mukoide mit alkoholhaltigen Lösungsmittelgemischen gemeinsam mit den übrigen Proteinen aus Blutserum gefällt werden, wurde angenommen, daß die im Extraktionsrückstand gefundene J-Aktivität auf den Mukoidanteil zurückzuführen ist. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigen aber, daß die J-Aktivität der Mukoide minimal ist gegenüber der J-Aktivität des gesamten Extraktionsrückstandes. Bei der Charakterisierung der von mir isolierten Mukoide ergab sich eine Verunreinigung mit anderen Bestandteilten des Serums, die sich wenigstens teilweise als J-aktiv erwiesen. Es ist daher wahrscheinlich, daß die Mukoide des Serums selbst überhaupt nicht J-aktiv sind, daß vielmehr die geringfügige J-Aktivität des Mukoidpräparates auf mitgeschleppte Verunreinigungen mit Glykoproteinen anderer Zusammensetzung beruht.

4.2. Serumproteine und -lipide

Die Bestimmung der Gesamtproteine im Serum von 10 Rindern erlaubt einen Vergleich mit Literaturwerten. Nach den im Biochemischen Taschenbuch (RAUEN, 1964) mitgeteilten Werten findet sich beim Menschen ein Proteinspiegel von 6,5-7,6 g/100 ml Serum. Bei

den meisten Säugetieren sind Werte in dem gleichen Bereich beschrieben. Das gilt auch für das Rinderserum (O'KELLY, 1972, 1973, 1973a). Nach MORRIS et al. (1955) findet sich im Rinderserum ein Proteinspiegel von 7,58 g/100 ml, nach den eigenen Untersuchungen ist der mittlere Proteingehalt 7,09 g/100 ml (Tab. 5). Am geringsten soll der Proteingehalt im Serum von Meerschweinchen sein (MORRIS et al., 1955). Von allen Säugetieren hat der Mensch den höchsten Gesamtlipidgehalt im Serum. RAUEN (1964) gibt einen Mittelwert von 560 mg/100 ml an, für das Rinderserum einen Wert von 350 mg/100 ml. O'KELLY (1972) fand je nach Rasse und Jahreszeit Werte von 200-472 mg/100 ml, KIRKEBY (1966) einen Mittelwert von 483 mg/100 ml. Die eigenen Untersuchungen (Tab. 4, 6, 7, 15 und 18) geben einen Mittelwert von 442 mg/100 ml .

Der Cholesteringehalt des Serums ist beim Menschen sehr häufig untersucht worden und spielt in der medizinischen Diagnostik eine große Rolle. Es ist bekannt, daß dieser Wert je nach dem Ernährungszustand großen Schwankungen unterworfen ist. So gibt RAUEN (1964) beim Menschen einen Gesamtcholesteringehalt von 145 und einen Gehalt von freiem Cholesterin in Höhe von 45 mg/100 ml an. Für die Populationen der wohlhabenden Länder ergeben sich jedoch wesentlich höhere Werte; so schätzt DULCE (1973) in Deutschland den Gesamtcholesterinspiegel des Erwachsenen im Alter von 20-50 Jahren auf 140-270 mg/100 ml, im Alter von 50-80 Jahren sogar auf 170-310 mg/100 ml. Es ist bekannt, daß der Cholesterinspiegel durch das mit der Nahrung zugeführte Cholesterin ansteigen kann, und zwar

nicht nur beim Menschen, sondern auch bei zahlreichen Versuchstierarten. Bei Säugetieren sind die Cholesteringehalte des Blutserums stets niedriger als beim Menschen. Das hängt wahrscheinlich mit der geringeren exogenen Zufuhr von Cholesterin zusammen. Speziell für Herbivoren ist ein niedriger Cholesterinspiegel zu erwarten, da Cholesterin nicht in pflanzlicher Nahrung vorkommt. Für das Rinderserum gibt RAUEN einen Mittelwert von 100, für das freie Cholesterin einen Wert von 40 mg/100 ml an, MORRIS et al. (1955) für das Gesamtcholesterin einen Mittelwert von 63 mg/100 ml. O'KELLY findet beim Rind je nach Rasse und Jahreszeit einen Gesamtcholesterinwert von 50-120 mg/ml, einen Wert für freies Cholesterin von etwa 10-24 mg/100 ml. Die eigenen Versuche, die zum größten Teil im Januar durchgeführt wurden, ergaben bei 20 Tieren einen Mittelwert von 120,4 mg/100 ml für Gesamtcholesterin und 20,0 mg/100 ml für freies Cholesterin (Tab. 15); die eigenen Werte zeigen starke Streuungen, die sich zwischen 43,0 und 192,0 mg/100 ml Gesamtcholesterin bewegen. O'KELLY (1973) fand im August (d.h. im australischen Winter) für das Gesamtcholesterin Werte von 92-120 mg/100 ml, Werte also, die in der gleichen Größenordnung wie die eigenen liegen.

Auch der Phosphatidspiegel des Blutserums scheint beim Menschen am höchsten zu sein, nämlich 160 mg/100 ml (RAUEN, 1964); nur beim Hund werden noch höhere Werte, nämlich 250 mg/100 ml, berichtet. Für das Rinderserum gibt RAUEN einen Mittelwert von 85 mg/100 ml mit einer Streuung von 50-150 mg/100 ml an, MORRIS et al (1955) ein Mittel von 125 mg/

100 ml. O'KELLY (1972) fand je nach Rasse und Jahreszeit Werte von etwa 60-130 mg/100 ml. In den eigenen Untersuchungen fand sich bei 5 Tieren (Tab. 8, 14 und 17) ein Mittelwert von 147 mg/100 ml.

Die eigenen Untersuchungen des Glycerid-Glycerin-Gehaltes bei zwei Tieren (Tab. 6) ergab einen Mittelwert von 17,8 mg Glycerin/100 ml. Dieser Wert ist in der Größenordnung des entsprechenden Wertes im menschlichen Serum, für den 12,9 mg/100 ml berichtet wird (THIELE, in Vorbereitung). Literaturwerte für das Rinderserum sind mir nicht bekannt.

4.3. Serummukoide

Hinsichtlich der Definition und der Klassifizierung der Mukoide herrscht eine nur schwer zu überschauende Verwirrung im Schrifttum. Unabhängig von verschiedenen Definitionen besteht jedoch Einmütigkeit darüber, daß Mukoide kohlenhydrathaltige Proteine sind. Als übergeordnete Bezeichnung für alle Proteine, in welchen der Kohlenhydratanteil an den Peptidanteil kovalent gebunden ist, wird allgemein die Bezeichnung "Glykoproteine" verwendet. Zur Unterteilung der Glykoproteine wurden und werden verschiedene Klassifizierungsprinzipien nebeneinander gebraucht. So kann man die Glykoproteine nach ihrem Vorkommen klassifizieren, nach der qualitativen Zusammensetzung ihres Kohlenhydratanteils, nach dem quantitativen Verhältnis zwischen Kohlenhydrat- und Proteinanteil, nach der Art der Aminosäure des Peptidanteils, der mit dem Kohlenhydratanteil verbunden ist, oder nach der Präparationsmethode, nach welcher das Glykoprotein gewonnen wurde; dagegen scheint sich die Aminosäure-

zusammensetzung des Peptidanteils nicht zur Klassifizierung der Glykoproteine zu eignen.

Nach SCHULTZE (1962) werden als Mukoide solche Glykoproteine bezeichnet, die zu mehr als 50 % aus Kohlenhydraten bestehen und einen komplexen (d.h. aus verschiedenartigen Monomeren zusammengesetzten) Kohlenhydratanteil besitzen. WINZLER (1955) beschreibt einige Eigenschaften von Mukoiden; danach sind diese in Perchlorsäure löslich, mit Phosphorwolframsäure und Ammonsulfat fällbar, jedoch nicht mit Sulfosalicylsäure und Trichloressigsäure. KLENK und UHLENBRUCK haben 1958 aus Stroma von Rindererythrozyten durch Phenolwasserextraktion ein Präparat gewonnen, das sie als Mukoproteid bezeichnen; ein auf dieselbe Art gewonnenes Präparat haben UHLENBRUCK und SCHMID später (1962) als Mukoid bezeichnet. Die in diesen beiden Publikationen niedergelegten analytischen Werte für Protein, Hexose, Hexosamin und Neuraminsäure stimmen größenordnungsmäßit mit denjenigen der von mir aus Stroma isolierten Mukoide überein, wenn man sie auf die von den genannten Autoren gewählten Bezugsgrößen umrechnet. Der hauptsächliche Unterschied zwischen meinen Werten und denen der genannten Autoren besteht darin, daß ich etwas mehr Protein gefunden habe als jene. Das von mir entsprechend aus Serum gewonnene Präparat habe ich auf Grund derselben Präparationstechnik auch als Mukoid bezeichnet, zumal es, wie die Analysen ergaben, kohlenhydratreich ist. Die aus Rinderserum erhaltenen Mukoide stimmen in einigen Eigenschaften mit denen der von WINZLER aufgeführte n Eigenschaften überein; vor allem ist die für die Proteine ungewöhnliche Lös-

lichkeit in Perchlorsäure zu erwähnen. Abweichend von WINZLER ergibt das von mir erhaltene Präparat durch Zusatz von Trichloressigsäure eine Trübung, die jedoch auch auf einer Beimengung von andersartigen Proteinen beruhen könnte.

Nach SCHULTZE et al. (1962) ist die Abgrenzung der Mukoide als durch bestimmte Löslichkeitsmerkmale gekennzeichnete Gruppe von Proteinen überholt. Aus einer Aufstellung von SCHULTZE et al. (1962) und immunoelektrophoretischen Untersuchungen (SCHULTZE et al., 1962a) ist zu entnehmen, daß ein von ihm als α_2-HS-Glykoprotein bezeichnetes, elektrophoretisch reines Präparat von anderen Autoren auch als α_2-HS-Mukoid, als Ba-α_2-Glykoprotein oder als α_2-Z-Globulin beschrieben worden ist. Für dieses Mukoid wurde ein Molekulargewicht von 49000 und ein isoelektrischer Punkt von 4,1 bzw. 4,3 (für die beiden Komponenten des Präparates) beschrieben (SCHMID und BÜRGI, 1961). Wenn das von mir aus Rinderserum isolierte Mukoid mit diesem aus menschlichem Plasma isolierten Präparat identisch oder zumindest ähnlich sein sollte, so müßten ähnliche isoelektrische Punkte und Molekulargewichte gefunden werden. Das ist, wie Tabelle 13 und Abbildung 12 und 13 zeigen, tatsächlich der Fall. Bei der Elektrophorese und der Elektrofokussierung stellte sich jedoch heraus, daß das von mir isolierte Präparat durch zahlreiche weitere Komponenten verunreinigt ist. Daß es sich um ein niedermolekulares Produkt handelt, geht auch aus den Ergebnissen der Gel-Filtration hervor. Wie Abbildung 15 zeigt, erscheint das Mukoid in der L-Fraktion, was auch den Angaben von FIREMAN et al. (1964) für das menschliche Mukoid entspricht.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß das aus Rinderserum mit Phenolwasser isolierte Produkt ein Mukoid ist, da es mit den von SCHMID und BÜRGI (1961) beschriebenen Merkmalen übereinstimmt. Das Mukoid ist wahrscheinlich nicht J-aktiv; vielmehr ist die nachgewiesene geringe J-Aktivität auf Beimengungen mit höhermolekularen Proteinen zurückzuführen.

4.4. Serumlipoproteine

Die Lipoproteine des menschlichen Serums sind in den letzten beiden Dezennien Gegenstand zahlreicher und gründlicher Untersuchungen gewesen, so daß eine umfangreiche Literatur vorliegt (Neuere Übersichten: HATCH und LEES, 1968; TRIA und SCANU, 1969; BURSTEIN und SCHOLNICK, 1973). Über tierische Serumlipoproteine ist dagegen viel weniger bekannt. Speziell die Lipoproteine des Rinderserums scheinen bisher noch nicht systematisch untersucht worden zu sein.

Tab. 21 zeigt eine Gliederung der Lipoproteine des menschlichen Serums, wie sie sich durch Ultrazentrifugation bei bestimmten Dichten ergeben. In derselben Tabelle sind auch andere Eigenschaften und die Zusammensetzung der verschiedenen Lipoprotein-Klassen angegeben. Hierbei ist zu bemerken, daß die Streuungen der angegebenen Prozentwerte relativ groß sind, so daß verschiedene Autoren of unterschiedliche Werte berichten; die in Tab. 21 enthaltenen Werte sind daher als relativ grobe Nährungswerte anzusehen. Durch spezielle Ultrazentrifugationstechniken lassen sich einige der aufgeführten Lipoprotein-Klassen in Unterklassen zerlegen; solche Unterklassen sind in der folgenden Betrachtung jedoch nicht berücksichtigt.

Die mir bekannten Untersuchungen von Rinderserum-Lipoproteinen betreffen entweder nur bestimmte Lipoprotein-Klassen oder nur methodische Teilfragen. So hat JONAS (1972, 1972a) nur die HDL-Fraktion des Rinderserums untersucht und dabei u.a. gefunden, daß diese Fraktion etwa 80 % der gesamten Lipoproteine ausmacht, während, wie sich aus den Daten der Tab. 21 errechnen läßt, die HDL Fraktion beim Menschen nur etwa 40 % der gesamten Lipoproteine ausmacht. GLASCOCK et al. (1966) haben mit Dextransulfat und $CaCl_2$ lediglich die β-Lipoproteine aus Rinderserum gefällt und charakterisiert; sie fanden u.a., daß die Gesamtlipide dieser Fraktion aus etwa 42 % Sterinen und 24 % Phosphatiden besteht. JENSEN (1963) hat elektrophoretische Studien von Rinderseren veröffentlicht, woraus lediglich aufgrund des färberisehen Verhaltens hervorgeht, daß Lipoproteine zugegen sind. GÖTZ et al. (1969) haben ebenfalls elektrophoretische Untersuchungen an Rinderserum angestellt, in welchen die Lipoproteine durch Lipidfarbstoffe sichtbar gemacht wurden; hierbei wurden 2 Banden gefunden, und zwar eine im α_1-Bereich, eine andere im α_2/β-Bereich. In einer vergleichenden Untersuchung an 10 Tierarten hat KIRKEBY (1966) den Gesamtlipidgehalt und den durch Papierelektrophorese ermittelten α- und β-Lipoproteingehalt des Serums bestimmt. Beim Rind fand er auf diese Weise 313 mg α-Lipoproteine/100 ml und 170 mg β-Lipoproteine/100 ml Serum; die α-Lipoproteine machten also 65 % der gesamten Lipoproteine aus, beim Menschen jedoch nur 30 % (bei ♂) bzw. 34 % (bei ♀). Schließlich haben ALEXANDER und DAY (1973) vergleichende elektrophoretische Untersuchungen der Serum-Lipoproteine auf Agarosegel durchgeführt. Sie fanden ebenfalls 2 Lipoprotein-

Fraktionen, und zwar 15 % in der langsamen (wahrscheinlich β), 85 % in der rasch wandernden Fraktion (wahrscheinlich α-Lipoproteine). Wenn auch in diesen letztgenannten Fällen beim Rind stets mehr α-Lipoproteine (entsprechend HDL) gefunden wurde als β-Lipoproteine (entsprechend LDL), so sind die erwähnten Zahlenangaben doch mit Vorsicht zu bewerten. Denn diese Analysen sind durch Vergleich der durch Lipidfarbstoffe angefärbten elektrophoretischen Banden durchgeführt worden, und es ist bekannt, daß solche Untersuchungen mit großen Fehlern behaftet sein können. Die zuverlässigste Methode zum quantitativen Vergleich der HDL- und LDL-Fraktionen sowie zu weiteren qualitativen und quantitativen Untersuchungen ist stets nur die präparative Isolierung der Lipoproteinfraktionen mit der Ultrazentrifuge. Auch kann damit klar die LDL-Fraktion von der VLDL-Fraktion getrennt werden, während im Schrifttum oft unklar ist, ob die LDL-Fraktion die VLDL-Fraktion einschließt oder nicht.

Chemische Analysen an allen durch Ultrazentrifugation getrennten Haupt-Lipoprotein-Fraktionen des Rinderserums wurden anscheinend erstmalig in dieser Arbeit durchgeführt. Allerdings wurden nur wenige Probanden untersucht, da der Hauptzweck der Arbeit nicht die Analyse der Lipoproteine, sondern die Erforschung der Verteilung der J-Aktivität war. Die wenigen Untersuchungen lassen jedoch Vergleiche mit den spärlichen Literaturdaten und Vergleiche mit den eigenen Ergebnissen zu, die durch Fraktionierung mit Polyanionen und mit der Gelfiltration erhalten wurden.

Die Charakterisierung der von mir gewonnenen Fraktionen durch Ultrazentrifugation entspricht im großen und ganzen den Charakteristika der menschlichen Lipoproteine.

Die von mir erhaltenen Daten für Rinderserum sind in Tab. 21 mit den Literaturdaten für menschliches Serum zusammengefaßt. So fand ich in VLDL einen Proteinanteil von rund 11 %, in LDL rund 24 % und in HDL 44 %. Der Proteinanteil der der Summe von VLDL- und LDL-Fraktion entsprechenden "B"-Lipoproteine (Tab. 20) ist dagegen mit 77,5 % viel größer, was auf die in den "B"-Lipoproteinen anwesenden Fremdproteine zurückzuführen ist. Daher sind die Konzentrationen der verschiedenen Lipide, wenn man sie auf die gesamten "B"-Lipoproteine bezieht, entsprechend geringer. Wie beim Menschen, so ist auch beim Rind LDL die cholesterinreichste und HDL die phosphatidreichste Fraktion. Die durch präparative Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen lassen auch ihre gravimetrische Bestimmung zu. Wie Tab. 21 zeigt, entspricht die Konzentration der Lipoproteinklassen im Rinderserum derjenigen im menschlichen Serum; nur ist die LDL-Fraktion beim Rind in viel geringerer Konzentration vorhanden. Hieraus folgt, daß der HDL-Anteil an den gesamten Lipoproteinen größer ist als im menschlichen Blutserum. Aus den Angaben in Tab. 21 ergibt sich ein Anteil der HDL von annähernd 60 %, was am besten mit den oben zitierten Versuchsergebnissen von KIRKEBY (1966) übereinstimmt. Wie Abb. 18 zeigt, sind in den Lipoproteinen geringerer Dichte auch Chylomikronen vorhanden, die naturgemäß in der VLDL-Fraktion angereichert sind; die Anwesenheit der Chylomikronen verrät sich im Lipoprotein-Elektropherogramm durch ihre Lokalisation an der Startlinie.

Die Ergebnisse der Ultrazentrifugation lassen sich mit denjenigen der Dextransulfatfällung und der Gelfiltration zur Deckung bringen. Aus den vorliegenden Daten ergibt sich, daß die "B"-Lipoproteine nach

Tab. 21: Übersicht über Eigenschaften und Zusammensetzung der Lipoproteinklassen des menschlichen Serums. Die Werte in Klammern entsprechen den eigenen Befunden am Rinderserum (Rind Nr. 7) aus Tab. 18 und 20.

Lipoprotein-Klasse	Molekulargewicht x 10^{-6} [a]	Dichte[d] g/ml	*S_f[a]	Elektrophorese[a]	Konzentration[b] mg/100 ml Rinderserum	Protein	Phosphatide	Chol.
						% des Lipoproteins [c]		
Chylomikronen	10^3 - 10^4	<0,95	>400	Start	-	2	7	9
VLDL	5 - 10	0,95-1,006	20-400	Prä-β	65-145 (68)	7 (11)	18 (25)	23 (20)
LDL	2,1 - 2,6	1,006-1,063	0- 20	β	390-440 (158)	21 (24)	23 (20)	47 (31)
HDL	0,2	1,063-1,21	-	α	300-460 (322)	46 (44)	27 (18)	19 (13)

[a] nach LEVY et al. (1971) [b] D. SEIDEL, in: G. SCHETTLER (1971) [c] LLOYD, zit. in: J. SOBRA (1967)

*SVEDBERG'sche Flotations-Einheit, bezogen auf eine Dichte von 1,063 g/ml bei 26° C.

Chol. = Cholesterin

Dextransulfatfällung auch die Prä-β-Lipoproteine enthalten, also LDL und VLDL. Dies ergibt sich vor allem aus den Tabellen 18 und 19. So beträgt der Lipidanteil der VDL- und der LDL-Fraktion 176,7 mg/100 ml Serum, der der "β" Lipoproteine 198,7 mg/100 ml Serum (Tab. 18); der Cholesteringehalt der VLDL- und der LDL-Fraktion 61,8 mg/100 ml, der der "β"-Lipoproteine 70,3 mg/100 ml (Tab. 19). Wenn man die Verluste bei der präparativen Ultrazentrifugation berücksichtigt, so stimmen die Werte für VLDL und LDL einerseits mit denen für "β"-Lipoproteine andererseits hinreichend gut miteinander überein.

Rechnet man die Cholesterin- und Phosphatidwerte der "β"-Lipoproteine von Rind Nr. 1 (Tab. 15 und 16) auf die Gesamtlipide der "β"-Lipoproteine um, so erhält man 40 % für Cholesterin und 28 % für Phosphatide. Diese Werte stimmen praktisch mit den von GLASCOCK et al. (1966) berichteten Werten von 42 % bzw. 24 % überein, die sich als Mittel von 31 bzw. 33 Tieren ergaben und auf prinzipiell gleiche Weise gewonnen wurden.

Das UV-Spektrum (Abb. 17) der "β"-Lipoproteine zeigt im Bereich von 400 bis 500 nm stärkere Absorptionen mit einem Maximum bei 450 nm und wenigstens 2 Schultern. Die β-Lipoproteine aus menschlichem Serum ergeben einen ganz ähnlichen Spektraltyp (GURD, 1959), jedoch mit etwas geringerer Extinktion; beim Maximum beträgt $E^{1\,\%}_{1\,cm}$ etwa 0,55, beim Rind jedoch 0,91. Dieser Spektraltyp kommt nach GURD (1960) vorwiegend durch die an β-Lipoproteine gebundenen Carotinoide zustande. Beim Rind finden sich also ebenfalls β-Lipoprotein-gebundene Carotinoide im Serum, und zwar in höherer Konzentration als bei Menschen, was bei einem Herbivoren einleuchtend ist, da alle Carotinoide pflanzlichen Ursprunges sind.

Alle Lipoproteine müssen als makromolekulare Proteine bei der Gelfiltration in der S-Fraktion erscheinen, was sich auch durch die Lipoprotein-Elektrophorese beweisen ließ. J-Aktivität fand sich aber auch in der M-Fraktion, was sicherlich auf die Anwesenheit von J-aktiven Glykoproteinen zurückzuführen ist. Ob auch im Proteinanteil der S-Fraktion eine J-Aktivität zu finden ist, hätte nach Lipidextraktion bestimmt werden können. Jedoch waren die zur Gelfiltration verwendeten Serumvolumina so gering, daß Lipidextraktionen der Eluate nicht durchgeführt werden konnten. Nach Dextransulfatfällung war nicht nur der Gesamtlipidextrakt der "β"-Lipoproteine J-aktiv, sondern auch der lipidfreie Rückstand. Diese, im Proteinanteil anzutreffende J-Aktivität kann jedoch nicht im Apoprotein der β-Lipoproteine lokalisiert sein, sondern muß an Fremdproteine der "β"-Lipoproteinfraktion gebunden sein, da nach Ultrazentrifugation die VLDL- und LDL-Fraktion nur im Lipidanteil, jedoch nicht im Apoprotein, J-Aktivität aufwiesen. Übereinstimmend mit der Abwesenheit der J-Aktivität im HDL war auch im Lipidanteil der "α"-Lipoproteine keine J-Aktivität zu finden.

In einer früheren Untersuchung am hiesigen Institut (KIRCHHOFF, 1972) fand sich die J-Aktivität in den aus den Membranen der Rindererythrozyten isolierten Proteinen, dort aber vorwiegend in der HDL-Fraktion. Aus diesem Befund kann im Zusammenhang mit den eigenen Befunden geschlossen werden, daß mit der Übertragung der J-Aktivität aus dem Blutplasma auf die rote Blutzelle in vivo ein struktureller Umbau in der Zellmembran verbunden sein muß.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die J-Blutgruppensubstanz des Rindes findet sich u.a. im Blutserum in gelöster Form und ist dort an mindestens 2 verschiedene Trägersubstanzen gebunden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, die chemische Natur dieser Trägersubstanz näher zu bestimmen. Serum von J-Merkmalsträgern wurde daher auf verschiedene Weise fraktioniert: Durch Extraktion der Gesamtlipide, durch Extraktion der Mukoide mit Phenolwasser, durch Gelfiltration, durch Fällung der "β"-Lipoproteine mit Dextransulfat und schließlich durch Ultrazentrifugation.

Die erhaltenen Fraktionen wurden folgendermaßen charakterisiert:

1. Der Gesamtproteingehalt des Serums betrug im Mittel 7,09 g/100 ml (10 Tiere), der Gesamtlipidgehalt 442 mg/100 ml (9 Tiere), der Gesamtcholesteringehalt 120,4 mg/100 ml (20 Tiere), der Gehalt an freiem Cholesterin 20,0 mg/100 ml (20 Tiere), der Phosphatidspiegel 147 mg/100 ml (5 Tiere), der Gehalt an Glyceridglycerin 17,8 mg/100 ml (2 Tiere) (das entspricht einem Triglyceridgehalt von 166 mg/100 ml, wenn ein mittleres Molekulargewicht für die Triglyceride von 860 angenommen wird), der Lipidzuckergehalt 1,39 mg/100 ml (3 Tiere) und der Lipid-Hexosamingehalt 0,27 mg/100 ml (3 Tiere). Die Tagesschwankungen der Konzentrationen verschiedener Lipidarten im Serum sind relativ gering (3 Tiere).

2. Durch Gelfiltration des Rinderserums wurden 3 Fraktionen erhalten, nämlich eine hochmolekulare (Mole-

kulargewicht über $1{,}6 \times 10^5$), eine mittlere (Molekulargewicht um $1{,}6 \times 10^5$) und eine niedermolekulare Fraktion (Molekulargewicht um 7×10^4). Die lipoprotein-elektrophoretisch im Serum nachgewiesenen beiden Lipoproteinfraktionen wurden nach Gelfiltration in der hochmolekularen Fraktion wiedergefunden.

3. Das aus Rinderserum isolierte Serummukoid erwies sich in seinen Eigenschaften als ähnlich einem aus menschlichen Serum gewonnenen α_2-HS-Mukoid; es war jedoch noch durch zahlreiche andersartige Proteine verunreinigt.

4. Die Fällung mit Dextransulfat + Calciumchlorid ergab, ähnlich wie beim Menschen, eine "β"-Lipoproteinfraktion, die etwa 75 % des Gesamtcholesterins des Serums enthielt. Elektrophoretische Studien zeigten, daß diese Fraktion frei von α-Lipoproteinen ist, jedoch noch eine Reihe anderer Proteine enthält. Die mit Dextransulfat und Calciumchlorid nicht fällbare Fraktion ("α"-Lipoproteine) erwies sich als frei von β-Lipoproteinen und enthielt außerdem alle übrigen Proteine, die nicht in der "β"-Lipoproteinfraktion enthalten waren.

5. Durch Ultrazentrifugation konnte das Rinderserum in 4 Fraktionen aufgeteilt werden: In die VLDL-, die LDL- und die HDL-Fraktion sowie den lipoproteinfreien Rest. Die Konzentration der verschiedenen Lipoproteinklassen und der Anteil an Proteinen, Phosphatiden und Cholesterin lag etwa in demselben Bereich, wie für Lipoproteine aus menschlichem Serum beschrieben wurde. Nur entsprach der geringere

Gesamtlipid- und Cholesterinkonzentration des Rinderserums ein entsprechend niedrigerer Gehalt an LDL, so daß das Verhältnis der Konzentration der HDL-Fraktion zur Konzentration der übrigen Lipoproteine etwa 60 % betrug - im Gegensatz zum menschlichen Serum, in dem sich nur etwa 40 % der gesamten Lipoproteine in Form der HDL-Fraktion finden.

Durch Bestimmung der J-Aktivität in allen daraufhin untersuchten Fraktionen des Rinderserums ergibt sich folgendes Bild:

Etwa 1/3 der J-Aktivität liegt in Form eines Lipides, etwa 2/3 in Form eines Nichtlipides, und zwar wahrscheinlich als Glykoprotein, vor. Die lipide J-Gruppe wird wiederum zu 1/3 in der VLDL-Fraktion transportiert, zu etwa 2/3 in der LDL-Fraktion, während die HDL-Fraktion frei von J-Aktivität ist. Die nichtlipide J-Substanz findet sich im lipidfreien Protein, jedoch nicht in einem der Apoproteine der Lipoproteinfraktionen.
Das Mukoid ist wahrscheinlich ganz frei von J-Aktivität, obwohl das mit Phenolwasser erhaltene Mukoidpräparat eine ganz geringe J-Aktivität aufwies, die jedoch wahrscheinlich auf Verunreinigung zurückzuführen ist.

6. LITERATUR

ALEXANDER, C., C.E. DAY (1973)): Distribution of serum lipoproteins of selected vertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 46B, 295-312.

BACKHAUSZ, R. (1967): Immunodiffusion and Immunoelektrophorese. Gustav Fischer Vergl., Jena.

BIGLEY, N.Y., R.W. CHANDLER, M.T. DODD (1958): Inhibition of Rh. (D) antibody by eluates from Rh. (D) erythrocytes, treated with mumps virus or the periodate ion. J. Immunol. 80, 85-93.

BLAKESLEE, D., W.H. STONE (1971): The J substance of cattle. Vox Sang. 21, 269-283.

BLIX, G. (1948): The determination of hexosamine according to Elson and Morgan. Acta Chem. Scand. 2, 467-473

BORGSTRÖM, B. (1952): Investigation on lipid separation methods. Acta Physiol. Scand. 25, 101-110.

BURGER, S.P., T. FUJII, D.J. HANAHAN (1968): Stability of the bovine erythrocyte membrane. Release of enzymes and lipid components. Biochemistry 7, 3682-3700.

BURSTEIN, M., J. SAMAILLE (1957): Sur la précipitation sélective des B-lipoprotéines du sérum par l'héparine et les héparinoides de synthese en présence du Cl_2Ca. J. Physiol. (Paris) 49, 83-86.

BURSTEIN, M., J. SAMAILLE (1958): Dosage des B-lipoproteines seriques après précipitation sélective par l'heparine. La Presse Medicale 43, 974-975.

BURSTEIN, M., H.R. SCHOLNICK, R. MORFIN (1970): Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by pretipitation with polyanions. J. Lip. Res. 11, 583-595.

BURSTEIN, M., H.R. SCHOLNICK (1973): Lipoprotein-polyanion-metal interactions. Advances in Lipid Research 11, 67-108. Academic Press, New York, London.

CAWLEY, L.P. (1969): Electrophoresis and Immuno-electrophoresis. Little, Brown and Co., Boston, Mass.

COFFIN, S.F., M.M. PICKLES (1953): The ability of trypsin to restore specific agglutinating capacity of erythrocytes treated with periodate. J. Immunol. 71, 177-182.

COHN, E.J., W.L. HUGHES, J.H. WEARE (1947): Preparation and properties of serum and plasma proteins. Crystallization of serum albumins from ethanol-water mixtures. J. Am. Chem. Soc. 69, 1753-1761.

CORNWELL, D.G., F.A. KRUGER (1961): Molecular complexes in the isolation and characterization of plasma lipoproteins. J. Lip. Res. 2, 110-134.

COURCHAINE, A.J., W.H. MILLER, D.B. STEIN (1959): Rapid semimicro procedure for estimating free and total cholesterol. Clin. Chem. 5, 609-614.

DODGE, J.T., C. MITCHELL, D.J. HANAHAN (1963): The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochim. Biophys. 100, 119-130.

DULCE, H.J. (1973): Klinisch-chemische Diagnostik. Urban und Schwarzenberg, München-Berlin-Wien.

FIDGE, N. (1973): The isolation and properties of pig plasma lipoproteins and partial characterisation of their apoproteins. Biochim. Biophys. Acta 295, 258-273.

FIREMAN, P., W.E. VANNIER, H.C. GOODMAN (1964): Immunochemical studies of human serum fractionated by gel filtration with sephadex G-200 (29054). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 4, 845-849.

FOLCH, J. I. ASCOLI, M. LEES, J.A. MEATH, F.N. LEBARON (1951): Preparation of lipide extracts from brain tissue. J. Biol. Chem. 191, 833-841.

GLASCOCK, R.F., V.A. WELCH, C. BISHOP, T. DAVIES, E.W. WRIGHT, R.C. NOBLE (1966):
An investigation of serum lipoproteins and of their contribution to milk fat in the dairy cow.
Biochem. J. 98, 149-156.

GORNALL, A.G., C.J. BARDAWILL, M.M. DAVID (1949):
Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.
J. Biol. Chem. 177, 751-766.

GÖTZ, H., A. HEINEBRODT (1969):
Die Serum proteine des Tieres. Biochemische und Immunoelektrophoretische Analysen des Rinderserums.
Zbl. Vet.-me. Reihe A 16, 691-702.

GURD, F.R.N. (1960):
In: HANAHAN, D., F.R.N. GURD, I. ZABIN: Lipide Chemistry.
J. Wiley and Sons, Inc., New York.

HAKOMORI, S.I., R.W. JEANLOZ (1961):
Isolation and characterization of glycolipids from erythrozytes of human blood A (plus) and B (plus).
J. Biol. Chem. 236, 2827-2834.

HANDA, S. (1963):
Blood group active glycolipid from human erythrozytes.
Japan. J. Exp. Med. 33, 347-360.

HATCH, F.T., R.S. LEES (1968):
Practical methos for plasma lipoprotein analysis.
Advances in Lipid Research 6, 1-68.
Academic Press, New York and London.

HOROWITZ, M.I., B.L. SLOMIANY (1970): water-soluble antigens absorbed on RBC. In: Blood and Tissue Antigens. Academic Press, New York, 131.

JANADO, M., W.G. MARTIN, W.H. COOK (1966): Separation and properties of pig-serum lipoproteins. Can. J. Biochem. 44, 1201-1209.

JENSEN, I.K. (1963): Elektrophoretic studies of normal bovine and guinea-pig serum. Acta Vet. Scand. 4, 64-84.

JONAS, A. (1972): Physicochemical properties of bovine serum high density lipoprotein. J. Biol. Chem. 23, 7767-7772.

JONAS, A. (1972a): Studies on the structure of bovine serum high density lipoprotein using covalently bound fluorescent probes. J. Biol. Chem. 23, 7773-7778.

KING, E.J. (1932): The colorimetric determination of phosphorus. Biochem. J. 26, 292-297.

KIRCHHOF, B. (1972): Über J-blutgruppenaktive Lipoproteine aus Rindererythrozyten. Diss. Med. Fak., Göttingen.

KIRKEBY, K. (1966): Total lipids and lipoproteins in animal species. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 18, 437-442.

KLENK, E.,
G. UHLENBRUCK (1958): Über ein neuraminsäurehaltiges Mucoproteid aus Rindererythrocytenstroma.
Z. Physiol. Chem. 311, 227-233.

KLENK, E.,
G. UHLENBRUCK (1958a): Über die Hemmwirkung des neuraminsäurehaltigen Mucoproteids aus Rindererythrocytenstroma im Virus-Hämagglutinationstest.
Z. Physiol. Chem. 312, 144.

KLENK, E.,
G. UHLENBRUCK (1960): Über neuraminsäurehaltige Mucoide aus Menschenerythrocytenstroma, ein Betrag zur Chemie der Agglutinogene.
Z. Physiol. Chem. 319, 151.

KOŚCIELAK, J.
K. ZAKRZEWSKI (1960): Substance from erythrocytes of blood group A.
Nature 187, 516-517.

KRITCHEVSKY, D.,
S.A. TEPPER,
P. ALAUPOVIC,
R.H. FURMAN (1963): Cholesterol content of human serum lipoproteins obtained by dextran sulfate precipitation and by preparative ultracentrifugation (28010).
Proc. Soc. exp. Biol. 112, 259-262.

LEVY, R.J.
D.W. BILHEIMER,
S. EISENBERG (1971): Structure and metabolism of chylomicrons and very low density lipoproteins (VLDL).
Biochemical Society Symposia 33, 19-28.
Academic Press, New York, London.

LLOYD, J.K. (1970): In: ŠOBRA, J.: Familiární hypercholesterolemická xanthomatosa. Thomayerova sbírka 456, strana 85 Avicenum Praha.

LOESCHCKE, V., H. STEGEMANN (1966): Polyacrylamid-Elektrophorese zur Beurteilung von Proteinen der Kartoffel (Solanum tuberosum L.). Z. Naturforsch. 21b. 879-888.

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

MACINTOSH, F.C. (1941): A method for estimating the potency of heparin preparations. Biochem. J. 35, 770.

MACKO, V. H. STEGEMANN (1970): Free electrofocusing in a coli of polyethylene tubing. Anal. Biochem. 37, 186-190.

MARCUS, D.M., L.E. CASS (1969): Uptake of glycosphingolipids with Lewis blood group activity by the human erythrocyte membrane. Fed. Proc. 28, 316. Science 164, 553-554.

MARGOLIS, S. (1969): In: Structural and functional aspects of lipoproteins in living systems (E. TRIA and A.M. SCANU, eds.). Academic Press, London, New York, 385-395.

MORGAN, W.T.J. (1963): Some observations on the carbohydrate containing components of human ovarium cyst mucin. Ann. N.Y. Acad. Sci. 106, 177-190.

MORRIS, B., F.C. COURTICE.(1955): The protein and lipid composition of the plasma of different animal species determined by zone electrophoresis and chemical analysis. Quart. J. Exp. Physiol. 40, 127-137. Edinburgh and London.

MÜLLER, H.E. (1968): Gelfiltration in der klinischen Diagnostik. Med. Klinik. 63, 125-128.

MURPHEY, W.H., G.B. KITTO, J. EVERSE, N.O. KAPLAN (1967): Malate dehydrogenases. I. A survey of molekular size measured by gel filtration. Biochemistry 6, 603-610.

O'KELLY, J.C. (1972): Seasonal variations in the plasma lipids of genetically different types of cattle: grazing steers. Comp. Biochem. Physiol. 43B, 283-294.

O'KELLY, J.C. (1973): Seasonal variations in the plasma lipids of genetically different types of cattle: steers on different diets. Comp. Biochem. Physiol. 44, 303-312.

O'KELLY, J.C. (1973a): Plasma lipid changes in genetically different types of cattle during hyperthermia. Comp. Biochem. Physiol. 44, 313-320.

PETZOLD, F.A. (1961): Lipide und Lipoproteide im Blutplasma. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg.

PLOTKIN, J. (1973): Über die Lipidmuster der Erythrozytenmembran des erwachsenen Rindes und des Kalbes. Diss. Med. Fak., Göttingen.

PORATH, L. P. FLODIN (1963): In: H. PEETERS, Protides of Biological Fluids. Elsevier Publ., Amsterdam.

RADIN, N.S., F.B. LAVIN, J.R. BROWN (1955): Determination of cerebrosides. J. Biol. Chem. 217, 790-796.

RAPP, W., W. KAHLKE (1968): Lipoprotein-Elektrophorese in Agarosegel. Clin. Chem. Acta 19, 493-498.

RAUEN, H.M. (1964): (Hrsgb.), Biochemisches Taschenbuch (2. Teil). Springer-Verlag, Berlin.

SCHMID, D.P. (1962): Zur Sonderstellung des Blutgruppensystems J beim Rind. Z. Immunitätsforsch 124, 101-114.

SCHMID, K., W. BÜRGI (1961): Preparation and properties of the human plasma Ba-α_2-glycoproteins. Biochim. Biophys. Acta 47, 440-453.

SCHMIDT, F.H., K. von DAHL (1968): Zur Methode der enzymatischen Neutralfett-Bestimmung in biologischem Material. Z. Klin. Chem. 6, 156-159.

SCHRÖFFEL, J.
O.W. THIELE,
J. KOCH (1971):
Studies on the attachment of the bovine J blood-group substance at the erythrocyte membrane.
Eur. J. Biochem. 22, 294-300.

SCHRÖFFEL, J.,
A. RADAŠ,
O.W. THIELE,
J. KOCH (1971a):
The blood-group substance of cattle. Studies in animals with J substance in serum and erythrocytes and animals with J substance only in serum.
Eur. J. Biochem. 22, 396-399.

SCHULTZE, H.E.
K. HEIDE,
H. HAUPT (1962):
Die mit Perchlorsäure nicht fällbaren Proteine des Humanserums.
Clin. chem. Acta 7, 854-868.

SCHULTZE, H.E.,
K. HEIDE,
H. HAUPT (1962a):
Charakterisierung eines niedermolekularen α_2-Mukoids aus Humanserum.
Naturwissenschaften 49, 15.

SEIDEL, D. (1971):
Plasmalipoproteine - Funktion und Charakteristik.
In: Fettstoffwechselstörungen (G. SCHETTLER, Hersg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

SLOMIANY, B.L.,
M.I. HOROWITZ (1971):
Cattle blood group J glycolipid. I. Isolation and identification of the trihexoside ceramide component of J hapten.
Immunochemistry 8, 719-732.

SPERRY, W.M. (1955):
Lipide analysis, method of biochemical analysis.
Interscience Publ. New York, London 2, 83.

STEGEMANN, H. (1970): Protein-Mapping, Schnell-Dialyse und Molekulargewichtsbestimmung im Mikrogramm-Bereich. Z. Anal. Chem. 252, 165-169.

STEGEMANN, H., H. FRANCKSEN, V. MACKO (1973): Potato proteins: genetic and physiological changes, evaluated by one- and two-dimensional PAA-gel-techniques. Z. Naturforsch. 28c, 722-732.

STEIN, W.H., S. MOORE (1949): Amino acid composition of β-lacto-globulin and bovine serum albumin. J. Biol. Chem. 178, 79.

SZULMAN, A.E. (1966): Chemistry, distribution, and function of blood group substances. Annul. Rev. Med. 17, 307-322.

THIELE, O.W. (1953): Die Acetalphosphatide des Blut-serums bei alimentärer Lipämie. Z. Ges. Exp. Med. 121, 246-253.

THIELE, O.W. (1967): Über die Lipidnatur des blutgrup-pen-spezifischen J-Haptens aus Rinderblut. Med. und Ernährung 8, 149.

THIELE, O.W. (1968): Zur Biochemie der J-Blutgruppe des Rindes. Klin. Wschr. 46, 1017.

THIELE, O.W.(1972): Biochemie der Blutgruppensubstanzen. Hippokrates 43, 401-413.

THIELE, O.W., J. HOJNÝ (1971): The chemical nature of pig-blood group substance dissolved in serum. Experientia 27, 447.

THIELE, O.W., J. KOCH (1970): The J blood-group substance of cattle: J Haptenic activity of glycosphingolipids of Serum. Eur. J. Biochem. 14, 379-386.

THIELE, O.W., B. URBASCHEK (1966): Untersuchungen zur chemischen Natur der J-Blutgruppe des Rindes. In: Polymorphismes Biochimiques des Animaux, X^{e} Congrèss Européen sur les Groupes Sanguins et le Polymorphisme Biochimique des Animaux. Paris, 97.

THIELE, O.W., W. WOBER, B. URBASCHEK (1962): Zur Biochemie des blutgruppenspezifischen J-Haptens aus Rinderserum. Naturwissenschaften 49, 208.

TRIA, E., A.M. SCANU, ed. (1969): Structural and functional aspects of lipoproteins in living systems. Academic Press, New York, London.

UHLENBRUCK, G., D.O. SCHMID (1962): Ein Mucoid mit Blutgruppeneigenschaften aus Rindererythrozytenstroma. Z. Immunitätsforsch. 123, 466-472.

URBASCHEK, B., O.W. THIELE (1958): Untersuchungen über ein blutgruppenspezifisches Halbhapten im Rinderblut sowie Beziehungen zum ABO-System und sein chemisches Verhalten. Naturwissenschaften 45, 318-319.

LRIEL, J. (1964): In: Immuno-Elektrophoretische Analyse (P. GRABAR und P. BURTIN, eds.). Elsevier, Amsterdam.

VANCE, D.E., C.C. SWEELEY (1967): Quantitative determination of the neutral glycosyl ceramides in human blood. J. Lipid Res. 8, 621-630.

VAN DEENEN, L.L.M., J. DE GIER (1964): In: The red blood cell (Ch. BISHOP und D.M. SURGENOR, eds.), 243. Academic Press, New York, London.

VESTERBERG, O., H. SVENSSON (1966): Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in neutral pH gradients. Acta Chem. Scand. 20, 820-834.

WALTON, K.W., C.R. RICKETTS (1954): Investigation of the histochemical basis of metachromasia. Brit. J. Exp. Path. 35, 227-240.

WALTON, K.W., P.J. SCOTT (1964): Estimation of the low-density (beta) lipoproteins of serum in health and disease using large molecular weight dextran sulfate. J. Clin. Path. 17, 627-643.

WARREN, L. (1959): The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J. Biol. Chem. 234, 1971-1975.

WATSON, D. (1960): A simple method for the determination of serum cholesterol. Clin. Chim. Acta 5, 637-643.

WELLS, M.A., J.C. DITTMER (1963): The use of sephadex for the removal of nonlipid contaminants from lipid extracts. Biochemistry 2, 1259-1263.

WINTROBE, M.M. (1967): Clinical hematology, 6th edition. Philadelphia.

WINZLER, R.I. (1955): Methods of biochemical analysis, Bd. 2, 279. Interscience, New York.

YAMAKAWA, T., T. IIDA (1953): Immunochemical study on red blood cells; globoside as agglutinogen of ABO system on erythrocytes. J. Jap. Exp. Med. 23, 327-331.

YAMAKAWA, T., M. MATSUMOTO, S. SUZUKI, T. IIDA (1956): The chemistry of the lipids of posthemolytic residue or stroma of erythrocytes. J. Biochem. 43, 41-52.

ZECH, R., K. ZÜRCHER (1973): Gel filtration and preparative free isoelectric focusing of rabbit serum phosphorylphosphatase. Life Sci. 13, 383-389.

Herrn Professor Dr. rer. nat. G. Birukow, dem Direktor des I. Zoologischen Institutes der Universität Göttingen, danke ich für sein Interesse und seine Mühe beim Überprüfen der von mir in der Tschechoslowakei erworbenen Universitätszeugnisse und für die freundliche Übernahme des Referates.

Für wertvolle technische Hilfe danke ich meinen Institutsmitarbeitern Frau E. Bodden und Herrn K.H. Haselmeyer.

Für die Beschaffung des Materials und den qualitativen Nachweis der J-Aktivität danke ich Herrn Dr. J. Koch vom Tierärztlichen Institut der Göttinger Universität.

Den Mitarbeitern desselben Instituts, Herrn Dr. H. Geldermann, Herrn Dipl. Biol. F. Thenns und Herrn Dr. P. Heeg aus München danke ich für die Hilfe und für die Bereitstellung der Elektrophorese-Ausrüstung.

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Dipl. Chem. O.W. Thiele, ohne dessen fachliche und menschliche Hilfe die Fertigstellung der vorgelegten Dissertation nicht denkbar gewesen wäre.

Lebenslauf

Am 30. 11. 1941 wurde ich, Antonín Radaš, als zweites dreier Kinder von Josef Radaš und Frau Marie, geb. Štveráková, in Písek, Tschechoslowakei, geboren.

Die Volksschule habe ich im Jahre 1953, die Mittelschule mit Abschlußexamen im Jahre 1956, und die Oberschule mit der Maturitätsprüfung am 3.6.1959 abgeschlossen.

Im Wintersemester 1959 begann ich an der Karls-Universität zu Prag mit dem Biologie- und Chemie-Studium.

Am 22.1.1963 bestand ich das Staatsexamen im Fach Chemie, am 20.10.1964 das Staatsexamen im Fach Biologie. Am 23.9.1964 verteidigte ich meine Diplomarbeit: "Sexueller Dimorphismus der Bachgrundel (Nemachilus Barbatulus L.) unter Berücksichtigung der Systematik" und erreichte durch den Beschluß der Staatlichen Prüfungskommission vom 22.10.1964 die Hochschulqualifikation als: Promovierter Biologe und Lehrer für Biologie und Chemie an Oberschulen.

Von Herbst 1964 bis Weihnachten 1968 war ich als Oberschullehrer in Prag tätig: Während dieser Zeit habe ich 2 weitere Semester nach dem Studienabschluß Zoologie der Fische als Externist studiert.

Aus Familiegründen reiste ich am 21.12.1968 in die Bundesrepublik Deutschland ein.

Vom März 1969 ab besuchte ich einen ganztägigen deutschen Sprachkurs, den ich am 27.8.1969 mit einem Examen abgeschlossen habe.

Am 1.10.1970 nahm ich im Physiologisch-Chemischen Institut der Georg-August-Universität zu Göttingen die Tätigkeit einer Hilfskraft in der Abteilung von Prof. Dr. Dipl. Chem. O.W. Thiele auf.
Am 1.4.1970 begann meine Tätigkeit als Wissenschaftlicher Mitarbeiter an demselben Institut. Am 17. April wurde ich an der Georg-August-Universität immatrikuliert. Seit Sommersemester 1971 bin ich auf Antrag des Direktors des Physiologisch-Chemischen Instituts mit der Betreuung des Physiologisch-Chemischen Praktikums für Studierende der Medizin beauftragt.